



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**"OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN LA FABRICACIÓN  
DE TEQUILA EN LA EMPRESA "TRANCAHUAICO" OÑA-PROVINCIA DEL  
AZUAY"**

Tesis previa a la obtención del  
Título de Bioquímico Farmacéutico

**AUTORES:**

JUAN ISRAEL GUILLERMO QUINDE  
ANDREA FERNANDA MACÍAS MATAMOROS

**DIRECTORA:**

DRA. SILVANA PATRICIA DONOSO MOSCOSO

**ASESORES:**

DRA. PAULINA DEL ROCIO ESCOBAR HINOJOSA  
DRA. SILVIA JOHANA ORTIZ ULLOA

**CUENCA – ECUADOR**



## RESUMEN

El objetivo fue realizar un estudio comparativo del rendimiento alcohólico de tequila a partir de diferentes fermentos (Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* del fermento artesanal, *Saccharomyces cerevisiae* Danstil EDV 493 y *Saccharomyces cerevisiae* ZWLDTY48) a partir de jugo de agave reposado y no pasteurizado que reflejaban las condiciones reales a nivel de fábrica.

Se identificó y aisló la levadura *Saccharomyces cerevisiae* presente en el chaguarmishqui y el fermento artesanal, aplicando la siembra por agotamiento en placas de medio YPD y la confirmación mediante pruebas bioquímicas y fermentativas. La fermentación se llevó a cabo en 5 replicados para cada una de las cepas de estudio. Los inóculos se introdujeron en muestras de jugo de agave que fueron sometidas a condiciones similares a la fábrica.

A nivel de laboratorio, se observó una diferencia significativa entre los volúmenes de cuerpo ( $P<0.001$ ) y los rendimientos alcohólicos ( $P<0.001$ ) de los tres fermentos. Con la *S. cerevisiae* ZWLDTY48 se obtuvo el mayor volumen de cuerpo en la destilación, el cual fue 4.1 veces mayor que la *S. cerevisiae* Danstil EDV 493 ( $P<0,001$ ) y ésta a su vez fue 7.6 veces mayor que la *S. cerevisiae* silvestre ( $P<0,001$ ). El rendimiento alcohólico relativo obtenido para la *S. cerevisiae* ZWLDTY48 fue 0.88 veces mayor que la *S. cerevisiae* Danstil EDV 493 ( $P<0,001$ ) y ésta a su vez fue 1.52 veces mayor que la *S. cerevisiae* silvestre ( $P<0,001$ ). El rendimiento alcohólico utilizando la *S. cerevisiae* ZWLDTY48 fue 11.2% y 9.7% a nivel de laboratorio y de fábrica, respectivamente.

**Palabras claves:** *Saccharomyces cerevisiae*, jugo de agave, tequila, fermentación, chaguarmisqui.



## ABSTRACT

The objective was to realize a comparative study of the alcoholic yield of tequila was carried out from different yeast strains (*Saccharomyces cerevisiae* strain artisanal ferment, EDV 493 Danstil *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces cerevisiae* ZWLDTY48) using agave juice. This juice was slightly ripened and unpasteurized, reflecting the actual conditions at factory level.

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* was identified and isolated from the craft ferment and “chaguarmishqui”. It was performed using the exhaustion sowing technique in YPD plates. Confirmatory analyses were carried out using biochemical and fermentation tests. Fermentation was carried out in 5 replicates for each of the three study yeast strains. The inoculums were introduced in agave juice samples and then those underwent similar conditions than at the factory.

At laboratory level, a significant differences between the distillation corp's volume ( $P<0.001$ ) and the alcoholic yield ( $P<0.001$ ) of the three ferments were observed. Using *S. cerevisiae* ZWLDTY48, the distillation corp's volume was the highest. It was 4.1 times higher than *S. cerevisiae* Danstil EDV 493 ( $P<0,001$ ) which subsequently was 7.6 times higher than *S. cerevisiae* silvestre ( $P<0,001$ ). The relative alcoholic yield obtained using *S. cerevisiae* ZWLDTY48 was 0.88 times higher than *S. cerevisiae* Danstil EDV 493 ( $P<0,001$ ) which was 1,52 times higher than *S. cerevisiae* silvestre ( $P<0,001$ ). The alcoholic yield using *S. cerevisiae* ZWLDTY48 was 11.2% and 9.7% at laboratory and factory level, respectively.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*, agave juice, tequila, fermentation, chaguarmishqui.



## ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	15
1. MARCO TEÓRICO.....	16
1.1. GENERALIDADES DE LA AGAVÁCEA AMERICANA.....	16
1.1.1. ORIGEN.....	16
1.1.2. TAXONOMÍA.....	17
1.1.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	17
1.1.4. USOS DEL AGAVE.....	19
1.2. CHAGUARMISHQUI.....	20
1.2.1. EXTRACCIÓN DEL CHAGUARMISHQUI.....	22
1.3. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....	22
1.3.1. FERMENTACIÓN A ESCALA INDUSTRIAL.....	25
1.3.1.1. Temperatura.....	26
1.3.1.2. pH.....	26
1.3.1.3. °Brix.....	26
1.3.1.4. Aireación.....	26
1.4 TEQUILA.....	27
1.4.1. DEFINICIONES.....	27



1.4.2. PROCESO DE ELABORACIÓN DEL TEQUILA.....	27
1.4.2.1. Jima del agave.....	27
1.4.2.2. Cocimiento de la piña.....	28
1.4.2.3. Extracción de la miel.....	28
1.4.2.4. Formulación.....	28
1.4.2.5. Fermentación.....	28
1.4.2.6. Destilación.....	29
1.5. LEVADURAS.....	32
1.5.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	33
1.5.1.1 Composición química.....	34
1.5.1.2. Requerimientos Nutricionales para la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	36
1.5.1.3. Inhibidores de crecimiento.....	38
1.5.1.4. Requerimientos físico-químicos.....	38
1.5.1.5. Tolerancia al etanol.....	39
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
2.1. MÉTODOS.....	40
2.1.1. DISEÑO Y TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	40
2.1.2. ZONA DE ESTUDIO.....	40
2.1.3. TEMPERATURA Y EXTENSIÓN.....	41
2.1.4. ALTITUD.....	41
2.2. MUESTREO Y TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	41



2.2.1 TIPO DE MUESTREO.....	41
2.2.2. MUESTREO PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL FERMENTO.....	41
2.2.3. MUESTREO PARA LOS ENSAYOS DE FERMENTACIÓN Y DESTILACIÓN.....	41
2.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN y EXCLUSIÓN.....	42
2.4. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.....	42
2.4.1. EXAMEN FÍSICO.....	43
2.4.1.1. Características organolépticas.....	43
2.4.1.2. Concentración °Brix.....	43
2.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL CHAGUARMISHQUI Y FERMENTO ARTESANAL.....	44
2.6. CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DEL FERMENTO ARTESANAL.....	46
2.6.1. TINCIÓN DE AZUL DE METILENO Y SUERO FISIOLÓGICO.....	47
2.6.2. PRUEBAS FERMENTATIVAS.....	47
2.6.3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS.....	47
2.6.4. FLOCULACIÓN.....	48
2.7. AISLAMIENTO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	48
2.8. FERMENTACIÓN.....	48
2.8.1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE LA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DEL FERMENTO ARTESANAL.....	48



2.8.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE LA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DANSTIL EDV 493.....	49
2.8.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE LA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZWLDTY48.....	49
2.9. PROCESO DE FERMENTACIÓN EN EL LABORATORIO.....	49
2.10. DESTILACIÓN EN EL LABORATORIO.....	49
2.11. PROCESO DE FERMENTACIÓN y DESTILACIÓN EN LA FÁBRICA.....	50
2.12. CÁLCULO DEL RENDIMIENTO ALCOHÓLICO.....	51
2.13. MATERIALES.....	52
2.13.1. EQUIPOS Y MATERIALES.....	52
2.13.2. TINCIONES.....	53
2.13.2.1. Azul de metileno.....	53
2.13.3. MEDIOS DE CULTIVOS.....	53
2.13.3.1. Medio Yeast pepton dextrose (YPD).....	53
2.13.3.2. Agua de peptona.....	54
2.13.4. PRUEBAS BIOQUÍMICAS.....	54
2.13.4.1. Agar bismuto sulfito.....	55
2.13.4.2. Pruebas de Fermentación.....	56
2.13.5. PRUEBA DE LA FLOCULACIÓN.....	57
2.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	58
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	59



3.1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS A NIVEL DEL LABORATORIO.....	59
3.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS A NIVEL DE LA FÁBRICA.....	65
4. CONCLUSIONES.....	67
5. RECOMENDACIONES.....	68
6. REFERENCIAS.....	69
7. ANEXOS.....	79
8. ILUSTRACIONES.....	111



Yo, ANDREA FERNANDA MACIAS MATAMOROS, autora de la tesis "OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN LA FABRICACIÓN DE TEQUILA EN LA EMPRESA "TRANCAHUAICO" OÑA-PROVINCIA DEL AZUAY", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 11 de Junio de 2014



ANDREA FERNANDA MACIAS MATAMOROS

0748000796

Yo, ANDREA FERNANDA MACIAS MATAMOROS, autora de la tesis "**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN LA FABRICACIÓN DE TEQUILA EN LA EMPRESA "TRANCAHUAICO" OÑA-PROVINCIA DEL AZUAY**", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de **BIOQUIMICA FARMACEUTICA**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 11 de Junio de 2014



ANDREA FERNANDA MACIAS MATAMOROS

0748000796

Yo, JUAN ISRAEL GUILLERMO QUINDE, autor de la tesis **"OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN LA FABRICACIÓN DE TEQUILA EN LA EMPRESA "TRANCAHUAICO" OÑA-PROVINCIA DEL AZUAY"**, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de **BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 11 de Junio de 2014



JUAN ISRAEL GUILLERMO QUINDE

0105469407

Yo, JUAN ISRAEL GUILLERMO QUINDE, autor de la tesis "OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN LA FABRICACIÓN DE TEQUILA EN LA EMPRESA "TRANCAHUAICO" OÑA-PROVINCIA DEL AZUAY", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 11 de Junio de 2014



JUAN ISRAEL GUILLERMO QUINDE

0105469407



## AGRADECIMIENTOS

A Dios por darnos la vida, a nuestros familiares por estar siempre a nuestro lado y brindarnos su apoyo incondicional.

A nuestras asesoras Dra. Johana Ortiz, Dra. Paulina Escobar, y Dra. Sonia Goercke por su persistente guía, quienes hicieron posible la conclusión de este trabajo, ya que con sus constantes aportes logramos la finalización del mismo.

Y un agradecimiento especial al Sr. Salvador Ortega y a su familia, por habernos permitido la realización de nuestra tesis en su fábrica, brindándonos un apoyo mutuo durante el desarrollo de esta labor.

A los docentes de nuestra querida Escuela Bioquímica y Farmacia que nos han acompañado durante el largo camino, brindándonos siempre su orientación con profesionalismo ético en la adquisición de conocimientos y afianzando nuestra formación universitaria. En especial a la Dra. Silvana Donoso por su aporte absoluto.

A todas y todos quienes de una u otra forma han colocado un granito de arena para el logro de este Trabajo de Grado, agradecemos de forma sincera su valiosa colaboración.

**JUAN Y ANDREA**



## DEDICATORIA

A mi hijo, Santiago y mi esposo, Juan, que son mi razón de vivir y me dan fuerzas para seguir adelante. Porque juntos haremos de nuestra vida un horizonte mejor. Los amo.

A mis padres, Jenny y Eduardo, por su inmenso amor, comprensión y apoyo. Gracias por brindarme el regalo de la educación y ser ejemplo de lucha. Por enseñarme que el sacrificio de hoy, es el triunfo del mañana.

A mis hermanos, José y Andrés, por nuestros momentos juntos y porque han sido mi soporte y los mejores amigos que he podido tener. También a mis pequeños: Matías y Eliana; deseo verlos crecer y triunfar.

A mi mami Rosa, por sus añorados consejos, y tan tiernos abrazos. A mis tíos y primos, que son como si fueran mis padres y hermanos. Porque junto a ustedes aprendí la importancia de la unión y el amor a la familia. Los extraño a diario.

ANDREA

Dedico este trabajo a Dios por darme la vida y bendecirme con una hermosa familia, a mis padres Jorge y Olga por el apoyo incondicional y por iluminar mi camino con ejemplo de respeto y responsabilidad; a mis hermanos Fernanda, Lenin y Andrés por ser mis fieles compañeros, cómplices y amigos, a mi tío Claudio y a mi abuela Mercedes por enseñarme que en la vida reír es muy importante.

A mi esposa Andrea y a mi hijo Santiago por ser el pilar fundamental de mi vida y por ser la inspiración de seguir adelante cada día.

JUAN



## INTRODUCCIÓN

El tequila se produce desde mediados del siglo XIX. En la Sierra Ecuatoriana, especialmente en el norte y austro existen comunidades que se dedican a la producción de tequila.

En algunas zonas, esta producción es considerada como emprendimientos y son patrocinados por los gobiernos locales para dinamizar la economía de las familias. Tal es el caso de la Fábrica Trancahuaico en el cantón Oña, donde producen el primer tequila del Ecuador con registro sanitario.

El tequila se produce a partir del agave, en el cual se “chagua” (extraer) el “misqui” (agua miel), de dónde proviene su nombre. Este líquido dulce, es sometido a un proceso de fermentación y destilación para la obtención de tequila.

En la Fábrica Trancahuaico, se produce el tequila con la levadura propia de la planta, *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo el rendimiento no es el deseado.

El objetivo de este trabajo fue optimizar el proceso de fermentación en la elaboración de tequila de la Fábrica “Trancahuaico”; el mismo que consistió en hacer una comparación entre los diferentes tipos de fermentos comerciales y el artesanal, en cuanto a la producción de etanol tanto a nivel de laboratorio e industrial.

Con este estudio se busca beneficiar a la Fábrica Trancahuaico, mejorando su proceso de fermentación y su economía, incrementado la producción de tequila.



## CAPITULO 1

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1. GENERALIDADES DE LA AGAVÁCEAE AMERICANA

##### 1.1.1 ORIGEN

El agave (*Agavaceae. americana* L), es una planta perenne resistente a terrenos áridos. Su nombre viene de la palabra griega “agave” que significa “noble” y se refiere a la alta inflorescencia escamosa presente en esta planta. (Freire Fierro, 2004).

Las palabras maguey y agave son sinónimos. La diferencia está en el uso que se le da a la planta. Del maguey se produce el pulque, bebida fermentada muy popular en México y de baja graduación alcohólica. El agave es la planta de cuyos jugos fermentados y luego destilados se obtiene el mezcal o el tequila. (Ibarra, 2001)

El agave es originario del continente americano, con la mayor concentración de especies nativas en México en donde se les conoce con el nombre de magueyes o mezcales. (Sampedro, 2009). En Ecuador, el agave se encuentra a lo largo del callejón interandino de la Sierra, frecuentemente como cercas vivas. (Cueva et al., 1999).

Las plantas de agave pueden encontrarse en gran diversidad de hábitats, desde valles y planicies hasta cerros y laderas pedregosas, incluyendo lugares montañosos de gran altitud. Se desarrollan mejor, tanto a nivel individual como poblacional, sobre planicies extensas con suelos aluviales, de profundidad y textura medias y pH de neutro a ligeramente alcalino. Conviven también con variados tipos de vegetación, destacando entre otros: la vegetación xerófita, pastizales, matorrales, bosques, etc. (García, Méndez, y Talavera, 2001)



### 1.1.2 TAXONOMÍA

La determinación taxonómica es importante en el aprovechamiento y manejo del agave. A continuación se describe una tabla con su división.

**Tabla 1:** Taxonomía del Agave americana

Fuente: Jurado y Sarzosa, 2007. Aspectos agrícolas de la cabuya negra

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Asparagales
Familia	Agavaceae
Genero	Agave
Especie	<i>Agave americana</i>

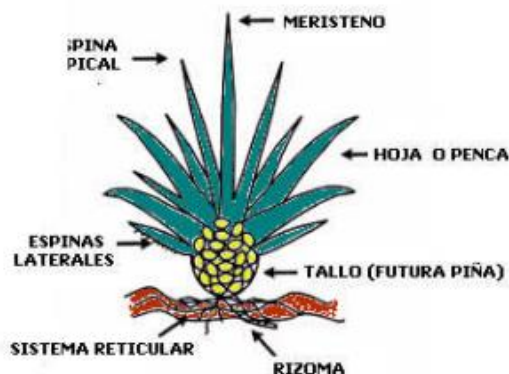
### 1.1.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

El agave o maguey es una planta que retiene agua y evita la erosión, con raíz generalmente superficial y que dependiendo del manejo agronómico y de las condiciones ambientales puede llegar a producir hijuelos o rizomas en uno a tres años, y en seis a ocho años otros productos (aguamiel, miel, pulque, mezcal, tequila, fibras, qurote o escapo, bulbillos y semilla).

Las partes principales del agave o maguey son: raíz, hijuelo o rizoma, cogollo o meristemo, piña o bola, penca u hoja, espina o puya y escapo o qurote. En la inflorescencia se producen las cápsulas con las semillas. Una planta puede llegar a producir unas 100,000 semillas. (Comité de Sanidad Vegetal, 2007)

Las hojas de entre 15 y 30 cm. de ancho y más de un metro de largo, crecen desde el suelo, grandes, lanceoladas y carnosas de color blanco-azulado o blanco-grisáceo, saliendo todas desde el centro donde permanecen enrolladas a un tallo central donde se van formando hasta su separación, con espinas en su borde de casi 3 cm muy duras, rígidas y finas. **(Figura 1)**

Todas las hojas terminan en una aguja fina de unos 5 cm de longitud y de hasta 1 cm de ancho en su parte menos extrema.



**Figura 1:** Anatomía del Agave.

Fuente: [acamextequila.com.mx./El agave](http://acamextequila.com.mx./El-agave)

Florece una sola vez en su vida (muere tras esta floración), aunque no sin haber dejado una copiosa descendencia en hijuelos o retoños de raíz en un tallo de unos ocho o diez metros y una anchura superior a los 10 cm de diámetro de él; desde más de la mitad de su longitud van saliendo pequeñas ramas en forma de pirámide terminando cada una en un grupo de flores de color amarillo-verdoso, cada flor tiene un tamaño de unos 5 a 10 cm. El fruto es una cápsula trigonal y alargada. (Sampedro, 2009)

Los agaves se reproducen de manera sexual y asexual. La reproducción sexual se logra mediante la polinización que efectúan algunos animales, principalmente murciélagos nectarívoros, en menor grado, insectos diurnos y nocturnos (palomillas, abejas, abejorros) y aves (colibríes, aves percheras).

En el maguey pulquero el sistema de reproducción es de tipo semélparo o monocárpico, es decir, las plantas mueren después de reproducirse; la semelparidad es una forma de reproducción poco común en las plantas con flores y pudo haber evolucionado debido a la altura de la inflorescencia, ya que las flores a mayor altura son más atractivas para los polinizadores; subsecuentemente, al incrementar las plantas progresivamente su esfuerzo reproductivo, los recursos



asignados al despliegue floral alcanzaron un máximo, causando la muerte de la planta.

La producción de frutos y semillas es grande en los agaves; producen hasta 65000 semillas, y una vez maduras son dispersadas por el viento.

La mayoría de los agaves se propaga de manera asexual, produciendo clones en diferentes partes de la roseta o la inflorescencia. Los hijuelos se desarrollan en la base de la planta, o mediante estolones emergen a alguna distancia de la planta madre, producen raíces y, con el tiempo, crecen de manera independiente. (Abisai, 2007)

#### 1.1.4 USOS DEL AGAVE

El agave ha tenido una gran diversidad de usos desde tiempos muy remotos, por ejemplo, ha sido utilizado como alimento, para la obtención de fibras textiles, para la construcción, entre otros. (**Tabla 2**)

Uno de los usos más relevantes de un número importante de especies de Agave; es la elaboración de mezcal o tequila y representa una actividad económica en potencia para el desarrollo de las regiones productoras de agave. El maguey está disponible para su uso en la elaboración de mezcal cuando adquiere una edad entre los 7 y los 12 años (punto de madurez fisiológica), lo que varía según la especie y de las condiciones agroecológicas y ambientales a las que hayan sido expuestos. (García, Méndez, y Talavera, 2001.)

**Tabla 2:** Usos que se les da a varias especies de Agave, productos y parte de la planta empleada

Fuente: García, Méndez, y Talavera, 2001. El género *Agave spp.* en México

	USO	PARTE DE LA PLANTA
<b>CONSTRUCCIÓN</b>	Cercas, casas, corrales.	Escapo floral (quite)
	Tejas. Canales para colectar agua de lluvia.	Hojas
	Materiales compuestos: resinas termoplásticas o termófilas, fibras.	Residuos de fibra
<b>FIBRAS</b>	Cordelería, y cestería. Escobetillas y cepillos para limpieza. Estropajos, tejido y vestuario.	Fibras de hoja
<b>ORNAMENTAL</b>	Arcos florales	Fibras de las hojas
	En jardines, calles.	Planta completa
<b>DOMESTICO</b>	Jabón o detergente para trastes y ropa.	Hojas, tallos y raíces
	Macetas, recipientes para agua.	Hojas y tallo (piña)
<b>OTROS USOS</b>	Industria química, farmacéutica, medicamentos y productos esteroides (saponinas).	Hojas, raíces, tallo y semilla.
	Productos de celulosa para papel. Producción de etanol, celulosa y glucosados.	Hojas (pulpa, residuos del desfibramientos, bagazo) Jugos

## 1.2 CHAGUARMISHQUI

El chaguarmishqui es un líquido dulce, de sabor agradable, color ambarino, inestable, que si hace calor, debe ser procesado en el día para evitar la fermentación. El chaguarmishqui y aguamiel son sinónimos del néctar del maguey, se los denomina de manera diferente dependiendo del lugar donde se haga uso de ésta bebida. En Ecuador, se lo conoce como chaguarmishqui, mientras que en México se lo conoce como aguamiel. (Ñamarín, 2009)

El chaguarmishqui o aguamiel (**Figura 2**), por diversos procedimientos, permite obtener bebidas estimulantes o fermentadas como el pulque, similar a una chicha, y del líquido obtenido del corazón asado, se producen por destilación, aguardientes de alta graduación alcohólica como el mezcal y tequila. Además de México y Mesoamérica, su utilidad como alimento ha sido señalada en todo el arco andino desde Colombia y Venezuela hasta Ecuador y Perú, donde se aprovecha el chaguarmishqui, el que es empleado para la fabricación de bebidas fermentadas. (Allauca, 2011)

Una planta de Agave puede producir hasta 2000 litros de aguamiel, o sea más de 100 libras de azúcar (Posee azúcares reductores totales (en glucosa) 6 – 12 g/100 mL y azúcares reductores directos (en glucosa) 3 g/100 mL). (Pardo, 2005)



**Figura 2:** Chaguarmishqui  
Fuente: Autores

Cada 100 g de chaguarmishqui contienen 5.30 g de extracto no nitrogenado y 0.4 g de proteínas, cantidad que aunque parece baja, es interesante por su composición en aminoácidos esenciales como: lisina, triptófano, histidina, fenilalanina, leucina, tirosina, metionina, valina y arginina. (Ramírez, 2010)

Contiene vitaminas del complejo B, niacina (0.4 a 0.5 mg), tiamina (0.0 2mg) y riboflavina (0.03 mg), y entre 7 y 11 mg de vitamina C, además de hierro (0.7 mg), calcio (11 mg) y fósforo (34 mg) por cada 100 g de aguamiel. (Allauca, 2011)



### 1.2.1 EXTRACCIÓN DEL CHAGUARMISHQUI

Cuando la planta de agave llega a su madurez, comienza a engrosarse el meristema floral, anunciando la formación del vástago florífero.

El operador se coloca de frente a la planta, haciéndose un camino, despejando las hojas que están rodeando la mata, para lo cual las corta a unos 30 o 40 cm. del suelo, de manera que le permitan acercarse sin herirse. Una vez alcanzado el centro, corta el meristema y con una barreta hace una cavidad en el centro de la planta, en la que se acumulará la savia.

La cavidad se la protege con una piedra o un pedazo de hoja de la misma planta, a fin de conservar la humedad del depósito e impedir que los animales domésticos, abejas, insectos o pájaros, sean atraídos.

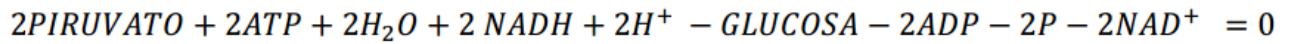
Diariamente se retira la savia producida por la planta, que es llamada “aguamiel”, después de lo cual se raspa el fondo de la cavidad para evitar la cicatrización. Se utiliza para esto un objeto áspero y con bordes afilados (como una cuchara, un tenedor, un raspador) adelgazando de algunos milímetros el parénquima y profundizando la cavidad. Algunas personas lo retiran hasta 3 veces por día si hace mucho calor, aunque lo más corriente es sacarlo por la mañana y la tarde.

A medida que avanza la madurez, aumenta el contenido de almidón y azúcares, mejorando el sabor. Se señala además que los dos primeros días iniciales el aguamiel, es muy fuerte y no es apta al consumo humano, empleándose como alimento de cerdos. Se empieza a usar el líquido sólo a partir del tercer día. (Romo, 1996)

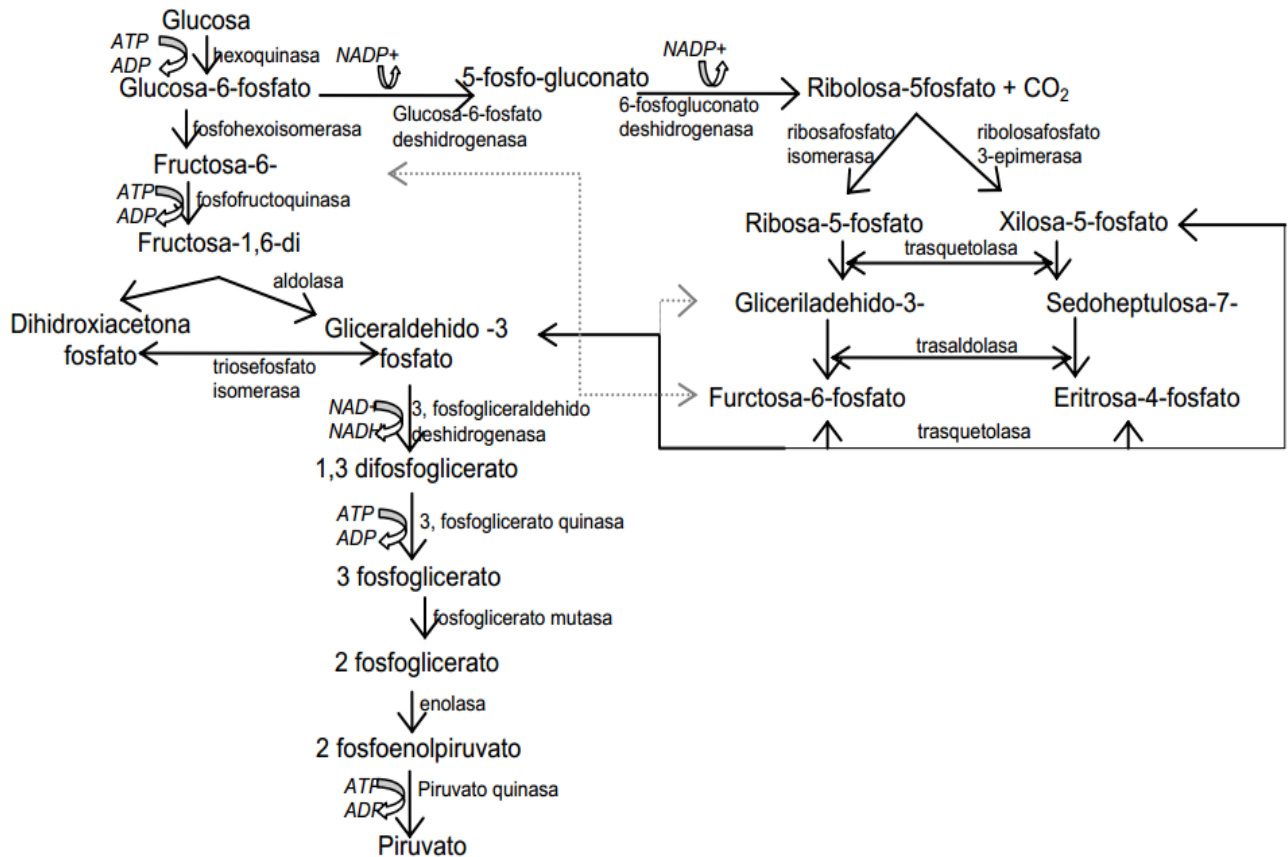
### 1.3. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La fermentación alcohólica, es un proceso anaeróbico realizado por levaduras y algunas clases de bacterias, donde el sustrato mono y di sacáridos en su mayoría, es transformado principalmente en alcohol etílico y dióxido de carbono; con la generación de equivalentes de reducción de los compuestos NADH/NAD<sup>+</sup>, NADHP/NADP<sup>+</sup> y ATP. Los procesos catabólicos inician luego de que los azúcares

son transformados en glucosa-6-fosfato o fructosa-6-fosfato. A partir de allí se desarrolla la glucólisis y el metabolismo del piruvato. (Acosta, 2012) **(Figura 3)**



**Ecuación 1:** Estequiometria de la ruta EMP o Embden-Meyerhorf-Parnas.

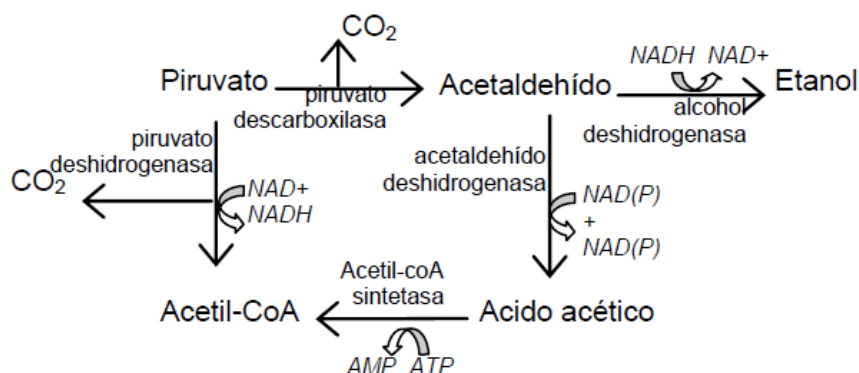


**Figura 3:** Sistema de reacciones en la glucólisis.

Fuente: Nielsen, 2003.

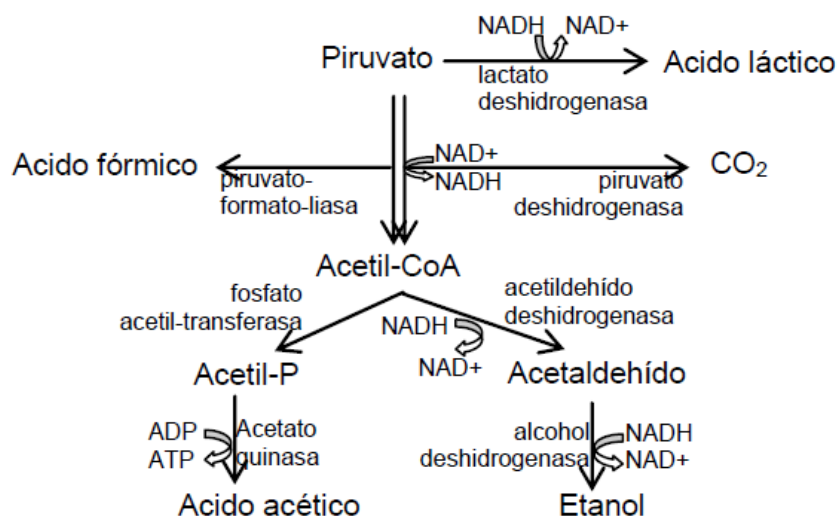
El ácido pirúvico obtenido en la glucólisis puede seguir dos vías. Una vía es aeróbica (respiración) y la otra es anaeróbica (fermentación). La vía aeróbica es la vía principal del metabolismo energético de las levaduras en presencia de oxígeno y la vía anaeróbica es la vía fermentativa que funciona en ausencia de un aceptor externo de electrones. (Acosta, 2012)

En las levaduras, el piruvato se descarboxila a aldehído para la generación de etanol, sin la intervención de Acetil-CoA. **(Figura 4)**



**Figura 4:** Metabolismo fermentativo en las levaduras.  
Fuente: Nielsen, 2003.

El acetato presente en el citosol, es posible sintetizar Acetil-CoA que se emplea como precursor de ácidos grasos, y por la acción del complejo enzimático piruvato-deshidrogenasa el Acetil-CoA mitocondrial puede iniciar una regeneración del NAD con reducción del piruvato a ácido láctico y/o acético, lo que se conoce como una fermentación mixta. (Acosta, 2012) **(Figura 5)**

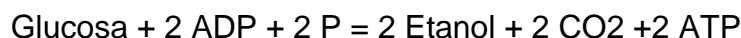


**Figura 5:** Metabolismo fermentativo mixto  
Fuente: Nielsen, 2003.





Aproximadamente el 96% de la producción del etanol mediante fermentación a nivel industrial se lleva a cabo mediante cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.



El rendimiento teórico de 1 gramo de glucosa es de 0.51 gramos de etanol y 0.49 gramos de CO<sub>2</sub>. Aproximadamente el 10% de la glucosa se transforma en biomasa y el rendimiento en etanol y CO<sub>2</sub> alcanzan el 90% del valor teórico. (Ramírez & Pedroza 2007)

### 1.3.1. FERMENTACIÓN A ESCALA INDUSTRIAL

La mayoría de las fermentaciones son procesos discontinuos, cuya cinética permite que los equipos utilizados en este proceso a escala industrial sean operados en intervalos. Al final del proceso, se procede a la recuperación de la levadura por centrifugación. Este sistema tiene la ventaja de disminuir los requerimientos de completa esterilización y así disminuye, el riesgo de pérdidas financieras y facilita el manejo de materias primas. La desventaja de este sistema es la decreciente productividad debido al largo tiempo de rotación y retraso en el crecimiento inicial.

Los procesos de fermentación discontinua son llamados también procesos en “lote. A tiempo cero, la solución esterilizada de nutrientes se inocula con microorganismos (*Saccharomyces crevesisiae*) y se incuba en condiciones óptimas de fermentación como un pH de 2.8 a 3.7 y una temperatura entre 28 y 37°C. A lo largo del proceso de fermentación se requiere de oxígeno (en forma de aire), un agente antiespumante (aceite de silicona) y ácidos orgánicos o hidroxisales para controlar el pH.

Una vez que una levadura y un sustrato (aguamiel) entran en contacto se requiere optimizar el proceso. Las variables más importantes a ser consideradas son: la temperatura, el pH y la aireación. (Fajardo & Sarmientos, 2007)

Se describen a continuación:



#### 1.3.1.1. Temperatura

La temperatura óptima de crecimiento de las levaduras especialmente de *Saccharomyces cerevisiae* es de 30 a 35°C. La temperatura afecta el crecimiento de manera notable, principalmente porque los microorganismos de una especie dada solo pueden crecer en un rango restringido de temperaturas, esto afecta de manera importante el crecimiento microbiano.

#### 1.3.1.2. pH

El pH es la medida de la concentración de iones hidrógeno y tiene un marcado efecto en la velocidad de crecimiento y el rendimiento. También el pH es óptimo para algunas especies como la de las levaduras que comprende un rango de 4.0 a 6.0. Un cambio en el valor de pH del medio puede afectar su composición y la naturaleza de la superficie microbiana al disociarse ácidos y bases. El pH tiene una gran influencia en los productos finales del metabolismo anaeróbico.

#### 1.3.1.3. °Brix

El °Brix o grados Balling es otra escala del hidrómetro utilizada en la industria azucarera. Normalmente las escalas brix se calibran a 15.6 a 20°C. Con la escala a 20°C, cada °Brix indica 1 gramo de sacarosa por cada 100 gr de líquido de agua.

En el chaguarmishqui la concentración de azúcares varía entre 4.5 y 7 °Baumé según la Norma NMX-V-022-1972. Aguamiel. Hydromiel. Normas Mexicanas. (**Anexo 1**), que corresponden a 5.5 y 10.5 °Brix respectivamente. (**Anexo 2**)

#### 1.3.1.4. Aireación

La ausencia o abundancia de oxígeno permite una selección tanto de microorganismo como de productos metabólicos. Cuando el cultivo se produce en presencia de oxígeno molecular, la fermentación se denomina fermentación aeróbica y cuando se realiza en ausencia de oxígeno molecular se denomina anaeróbica. Si la fermentación es anaeróbica, la mayor parte del carbono se emplea como energía y solo el 2% se asimila como material celular. (Nieto, 2009)



## **1.4 TEQUILA**

### **1.4.1. DEFINICIONES**

Tequila es una bebida alcohólica típicamente mexicana, obtenida por la fermentación, destilación y rectificación de mostos preparados con los azúcares extraídos de las cabezas del agave azul tequilana Weber, permitiéndose adicionar hasta un 49% de otros azúcares en la preparación de dichos mostos.

Dependiendo de sus características, el tequila se clasifica en cuatro tipos (Macías, 2001):

1. Tequila blanco: es el producto obtenido de la destilación y rectificación, ajustado con el agua de dilución a su graduación comercial. Es la presentación más barata.
2. Tequila joven abocado: es el mismo que el tipo blanco, sólo que se realiza el proceso de abocado consistente en suavizar el tequila mediante la adición de uno o más suavizantes y colorantes permitidos.
3. Tequila reposado: es aquel que se obtiene luego de dejarse en recipientes de madera de roble o encino durante por lo menos dos meses y que es susceptible de ser abocado.
4. Tequila añejo: si el tiempo de maduración es de 18 meses, se produce el tequila añejo que es el más caro en el mercado; también es susceptible de ser abocado y ajustado con agua de dilución a su graduación comercial.

### **1.4.2. PROCESO DE ELABORACIÓN DEL TEQUILA**

#### **1.4.2.1. Jima del agave**

La jima consiste en cortar las hojas de la planta al ras de la base, para dejar únicamente la cabeza o corazón de agave. El proceso de fabricación se inicia con el cocimiento y la molienda de las piñas o cabezas de agave.



#### **1.4.2.2. Cocimiento de la piña**

El cocimiento se realiza con vapor de agua a presión, ya sea en los tradicionales hornos de mampostería o en autoclaves. El tiempo de cocimiento en hornos de mampostería es de 48 horas mientras que en autoclaves es de 12 horas. La finalidad de esta etapa es convertir la inulina (azúcar del agave) en azúcares simples como fructuosa y sacarosa, los cuales son fácilmente fermentables. Al terminar el cocimiento el agave cocido se transporta a molinos donde se corta en pequeños trozos de algunos centímetros.

#### **1.4.2.3. Extracción de la miel**

Para extraer las mieles del agave cocido se aplica agua a presión al bagazo y luego se exprime en bandas transportadoras. Las mieles son entonces separadas para continuar el proceso industrial, mientras que el bagazo se desecha.

Las mieles extraídas del agave cocido son captadas en depósitos. Luego son transportadas por tuberías a las tinas de formulación, para la elaboración de Tequila 100 % de agave, según sea el caso.

#### **1.4.2.4. Formulación**

Consiste en mezclar las mieles del agave, en una proporción 51:49, con un preparado de otras mieles, (azúcar estándar, piloncillo, glucosa, fructuosa, melaza, etc.), para posteriormente ser fermentadas.

#### **1.4.2.5. Fermentación**

La fermentación se lleva a cabo en grandes tinas de acero inoxidable que son cargadas con las mieles, también llamadas mostos. A los mostos se les agrega agua, levaduras y nutrientes (vitaminas del complejo B) para la fermentación.

El tiempo de fermentación varía de acuerdo con la temperatura ambiental, y ésta, a su vez, cambia con cada época del año. Sometida a bajas temperaturas en invierno, la fermentación se prolonga más de 24 horas.

El mosto en plena fermentación es efervescente, y el movimiento cesa cuando las levaduras terminan su trabajo. En ese momento finaliza el proceso y las levaduras han terminado la conversión de azúcar en alcohol.

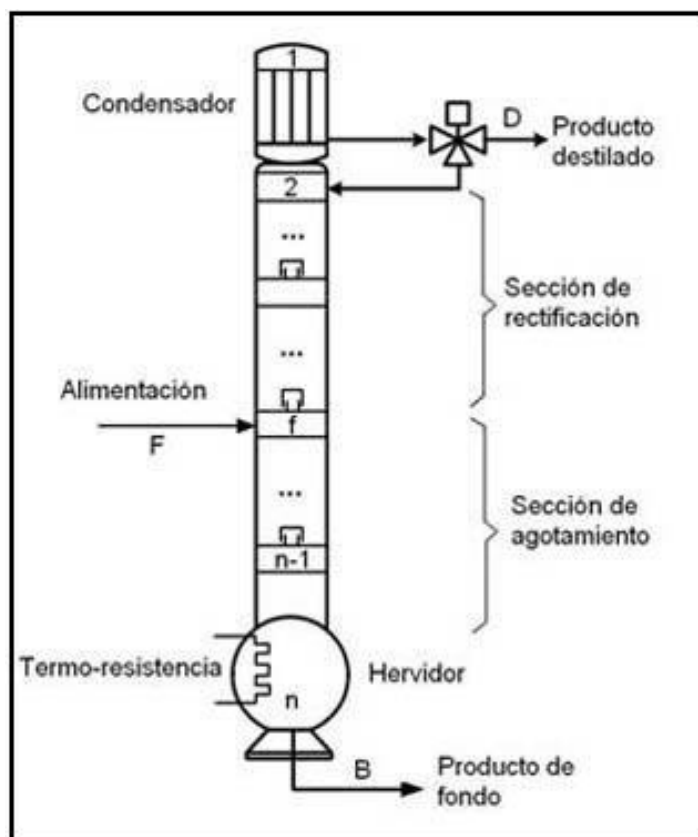
#### **1.4.2.6. Destilación**

Durante la destilación se aplica calor y presión, y se separan los fermentos en productos de riqueza alcohólica y vinazas, estas últimas constituyen un producto de desecho.

El proceso se efectúa en alambiques de cobre o acero inoxidable, e incluso en torres de destilación continua. Los alambiques comunes constan de tres partes: la olla o caldera, donde se deposita el mosto para su calentamiento; la columna o capitel, que recoge y conduce los vapores, y el serpentín, en el que se enfrían los vapores y se vuelven líquidos. **(Figura 6)**

Los puntos de ebullición de los diferentes compuestos así como los diversos volúmenes y presiones del alambique ayudan a la separación de gases, que se condensan en productos de mayor riqueza alcohólica. En la elaboración del tequila son necesarias dos destilaciones, la primera llamada destrozamiento y la segunda, rectificación.

Con la rectificación se incrementa la riqueza alcohólica y se eliminan los productos indeseables, obteniendo así uno de mayor pureza. Al Tequila que se recibe del destrozamiento o primera destilación se le llama “Tequila ordinario”, y el que termina la segunda destilación o rectificación es considerado como “Tequila blanco”. (Consejo Regulador de Tequila, 2011)



**Figura 6:** Destilación de etanol a nivel industrial  
Fuente: manunez2@iq.uson.mx / 2014

En el proceso de destilación se pueden diferenciar las siguientes partes del destilado:

- **Volumen inicial (V1)**

El volumen inicial corresponde al mosto tequilero antes de la destilación.

- **Volumen final (V0)**

El volumen final corresponde al residuo del volumen cocinado del chaguarmishqui.

- **Cabeza del destilado**

Corresponde a la parte más volátil del destilado. La cabeza es la primera en salir por cuanto tiene puntos de ebullición más bajos. La cabeza está compuesta por



sustancias como la acetona, metanol, y varios ésteres que deben ser eliminados pues son perjudiciales para el consumo humano.

Normalmente se separan los primeros 50 mL por cada 25 litros de destilado cuando se utiliza un alambique de columna, o 100 mL por cada 20 litros cuando se utiliza un alambique tradicional. Para evitar que las cabezas contaminen el resto del destilado se debe controlar la temperatura, pues éstas entran en ebullición a partir de los 55 - 78.4°C, normalmente tienen un sabor amargo. (Vásquez & Vásquez, 2009)

#### ● **Cuerpo del destilado**

Es la mejor parte de la destilación y entra en ebullición a partir de los 78.4 a 82°C a una concentración de 45 a 65 % de alcohol. El cuerpo es reconocido por el destilador a través de su color ampliamente transparente.

El cuerpo es el aguardiente propiamente dicho, el cual es almacenado a temperatura ambiente en un depósito de acero inoxidable.

#### ● **Cola del destilado**

Las colas o rabos tienen alcoholes con un punto de ebullición más elevado como son los furfurales, presenta poco a poco una aprobación alcohólica que se va debilitando y que producen en el destilado un mal sabor y es descartado.

Las fracciones de la destilación como: cabezas y colas que no son consideradas como bebidas alcohólicas por tener compuestos nocivos para el ser humano, pueden tener un uso industrial como solventes para el caso de las cabezas y, de las colas se puede hacer una re destilación y obtener un alcohol de mayor grado que también puede tener un uso industrial. (Villanueva, 2013)

#### ● **Pérdida del destilado**

Es el volumen que se pierde durante la destilación. Se debe a las características del aparato de destilación, si está bien armado y ajustado en las juntas; y debido a un retardo de la condensación de vapores en el refrigerante.



### ● Rendimiento alcohólico

Es el rendimiento de alcohol obtenido del cuerpo en porcentaje, durante el proceso de destilación. En donde:

- La cantidad real obtenida del producto, dividida por la cantidad teórica máxima que puede obtenerse (100%) se llama rendimiento.
- La cantidad de producto que debiera formarse si todo el azúcar se consumiera en la reacción, se conoce con el nombre de rendimiento teórico.

## 1.5 LEVADURAS

Las levaduras son hongos muy pequeños, unicelulares, que sólo pueden verse a través de un microscopio. Se alimentan de azúcares de los que obtienen energía en el proceso denominado fermentación. Las levaduras son raramente tóxicas o patogénicas y pueden ser utilizadas en la alimentación humana. A pesar de que su contenido de proteínas no excede el 60%, su concentración de aminoácidos esenciales tales como la lisina, el triptófano y la treonina es satisfactoria, aunque tiene un bajo contenido de metionina y cisteína. Las levaduras son muy ricas en vitaminas (grupo B) y su contenido en ácidos nucleicos es bajo ya que está en el rango de 4 a 10%. (Petrenko, 2005)

La forma de las levaduras puede ser desde esférica a ovoide, alimonada, piriforme, cilíndrica, triangular, e incluso alargada, constituyendo un verdadero micelio o un falso micelio.

Para su crecimiento necesitan oxígeno, fuentes de carbono orgánicas y nitrógeno mineral u orgánico, diversos minerales y una temperatura y pH adecuados.

El intervalo de temperaturas de crecimiento de la mayoría de las levaduras es, en general, parecido al de los mohos, con una temperatura óptima en torno a los 25 a 30°C y una temperatura máxima en torno a los 35 a 47°C. Algunas especies son capaces de crecer a temperaturas de 0°C o inferiores. (Méndez, 2011)



Las levaduras utilizan numerosos sustratos carbonados, bien sea por vía oxidativa o por vía fermentativa, después de una fase inicial de crecimiento aeróbico. En este último caso, vía fermentativa o anaeróbica, se produce etanol y CO<sub>2</sub>. El pH óptimo para el crecimiento de las levaduras varía de 4,5 a 6,5.

La mayoría de las levaduras se reproducen asexualmente por gemación polar, mecanismo de reproducción mediante el cual una porción de protoplasma sobresale de la pared de la célula de la levadura y forma una protuberancia; esta protuberancia, o yema, aumenta de tamaño y finalmente se desprende como célula de levadura neoformada. (Beitia, 2001)

Las levaduras son seres vivos y sus características morfológicas y químicas influyen decisivamente en su vida celular.

**Tabla 3:** Características de Levaduras

Fuente: Fajardo & Sarmientos, 2007. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*

CARACTERÍSTICAS LEVADURAS	
Dimensiones (µm)	4 - 8
Tiempo de duplicación (h)	1 - 3
Ph (rango óptimo)	4,5 - 5,5
Nitrógeno (%)	7,5 - 8,5
Proteína (%)	35 - 45
Ácidos nucleicos (%)	6 - 12
Carbohidratos (%)	30 - 45

#### 1.5.1. *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* es una levadura cuya colonia es de color crema o blanco, apariencia húmeda y brillante, de bordes irregulares. **(Figura 4)**

La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30°C. Puede producir ascosporas cuando hay requerimientos nutricionales adecuados. (Fajardo & Sarmientos, 2007)



**Figura 7:** Vista macroscópica de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPD  
Fuente: Autores

Son esféricas, elípticas y cilíndricas su tamaño varía notablemente pero el diámetro de la *Saccharomyces cerevisiae* oscila de 2 a 8 micras. (Nieto, 2009)

La clasificación taxonómica de la levadura es la siguiente:

**Tabla 4:** Clasificación Taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*.

Fuente: Fajardo & Sarmientos, 2007. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*

Clasificación Taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	
<b>Reino</b>	Hongo
<b>División</b>	<i>Amastogomycota</i>
<b>Clase</b>	<i>Ascomycetes</i>
<b>Subclase</b>	<i>Hemiascomycetidae</i>
<b>Orden</b>	<i>Endomycetales</i>
<b>Familia</b>	<i>Sacchaomycetaceae</i>
<b>Subfamilia</b>	<i>Saccharomycetidae</i>
<b>Género</b>	<i>Saccharomyces</i>
<b>Especie</b>	<i>Cerevisiae</i>

*Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más conocida a nivel industrial. Esta levadura es utilizada por excelencia para la obtención de etanol debido a que es un organismo de fácil manipulación y de recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, no demanda altos costos. Además esta levadura, tolera altas concentraciones de etanol, produce bajas concentraciones de subproductos durante la fermentación, es osmotolerante, presenta alta viabilidad celular para el reciclaje y, características de floculación y sedimentación para el procesamiento posterior. (Fajardo & Sarmientos, 2007)

#### 1.5.1.1 Composición química

Las levaduras contienen un 75% de agua y un 25% de materia seca aproximadamente conformada por macromoléculas y materia orgánica.

**Tabla 5:** Composición química de las levaduras

Fuente: Fajardo & Sarmientos, 2007. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*

Composición química de las levaduras.

COMPONENTES	PORCENTAJE (%)
Ceniza	7
Carbohidratos	43
Proteína	48
Grasa	2

Las sustancias minerales de las levaduras representan por lo general un 5 – 9% del peso seco. Los componentes principales son ácido fosfórico, alrededor del 50% y potasio del 30%. Las sustancias nitrogenadas de la levadura representan unas dos terceras partes de su peso seco (30 – 75%), contienen entre 5 y 12% de Nitrógeno. Estas sustancias se reparten en un 64% de proteína, 10% de peptonas y aminoácidos, 8% de amonio, 10% de purina y el resto consiste en pirimidinas y vitaminas. El contenido normal de aminoácidos depende de la alimentación, de la cantidad de oxígeno, de la temperatura del cultivo, etc.

En la siguiente tabla se detallan las principales macromoléculas presentes en la levadura *S. cerevisiae*. (Cáceres & Reyna. 2002)

**Tabla 6:** Macromoléculas esenciales para la *S. cerevisiae*  
Fuente: Cáceres & Reyna. 2002. Modelamiento microbiológico para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

MACROMOLÉCULA	CLASE	FUNCIÓN
Tubulina	proteína	Compone la mayor parte de las proteínas microtubulares citoplasmáticas
Actina	proteína	Filamentos de actina toman parte en la localización de vesículas en el proceso de gemación
Proteínas ribosomales	r-proteína	Conforman los ribosomas citoplasmáticos
Invertasa	glicoproteína	Constituyente de la membrana celular
Glucógeno	polisacárido	Depósito de sustancias de reserva en la pared celular
Polifosfato	poli y pirofosfato	Se encuentra en vacuolas y exterior a la membrana celular. Además de su función de reserva ayuda a la adición de aminoácidos básicos en la vacuola
Quitina	polisacárido	Se encuentra en las cicatrices gemaes de la pared celular
Manoproteína	proteína	Componente de la pared celular
Ergosterol	lípidido	Principal constituyente de las partículas lipídicas
Triglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos libres	lípidos	Sirven como bloques de construcción de los lípidos de la membrana
MRNA	ácido ribonucleico	Se sintetiza primero como molécula precursora que se procesa posttranscripcionalmente para que, finalmente se produzcan mRNA traducibles
RRNA	ácido ribonucleico	Cada ribosoma contiene cuatro moléculas de rRNA. La maduración y síntesis del rRNA es similar al de los eucariotas
TRNA	ácido ribonucleico	Existen aproximadamente 400 genes tRNA y están distribuidos a lo largo del genoma de la levadura

#### 1.5.1.2. Requerimientos Nutricionales para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* requiere ciertos nutrientes y condiciones ambientales para su apropiado crecimiento y reproducción. Algunos elementos son necesarios como por ejemplo carbono, hidrogeno, oxígeno, nitrógeno y fósforo. (Buitrago & Tenjo, 2007)

Carbono: Los compuestos carbonados son utilizados a la vez como fuente de energía y como fuente de carbono por *Saccharomyces cerevisiae*. Los principales son D-azúcares como hexosas, glucosa, fructosa, manosa, porque los L-azúcares pueden ser considerados no fermentables por esta levadura.



- **Nitrógeno:** Este elemento representa alrededor del 10% de peso seco de las levaduras, *S. cerevisiae* es capaz de utilizar el nitrógeno en forma de ión amonio. Otra fuente de nitrógeno son los aminoácidos, los dipéptidos, tripéptidos, y la urea en asociación con biotina y las bases púricas y pirimídicas.
- **Fósforo:** Es esencial para el crecimiento, regula la síntesis de los lípidos y los carbohidratos, y mantiene la integridad de la pared celular. El fósforo es asimilado por la célula en forma de iones ortofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ). Para una fermentación óptima el medio de cultivo debe contener fuentes de fósforo en una concentración de 0.6 mM/g de células.
- **Azufre:** Constituye el 0.4% del peso seco de las levaduras. La fuente de azufre más utilizada por *Saccharomyces* es el sulfato de amonio, el sulfito y el tiosulfato; la metionina puede ser utilizada como fuente única de azufre y permite un crecimiento más rápido que los iones sulfatos.
- **Elementos traza:** Minerales tales como K, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn, Cl. Se requiere en concentraciones de 0.1–1 mM. El potasio a pH ácidos estimula la fermentación y la respiración, actúa como efector de numerosas enzimas: piruvato quinasas, aldolasa, aldehído deshidrogenasa y permeasa e interviene en la estructura de los ARN. Las fuentes de potasio son el cloruro potásico y los fosfatos mono y dipotásico. El magnesio es utilizado como activador de las enzimas glicolíticas, estimula la síntesis de ácidos grasos, regula las ATPasas de las membranas y participa con el potasio en la penetración del fosfato. El magnesio es aportado en los medio de cultivo en forma de sulfato o de cloruro de magnesio.
- **Microelementos:** Co, B, Cd, Cr, Cu, I, Mo; Ni, Va. Se requieren concentraciones 0.1 - 100µM. Otros microelementos (Hg, Ag, Ar, Ba, Li, Ni, Os, Pb, Se, Te) pueden actuar como inhibidores del crecimiento de la levadura cuando se encuentran en concentraciones superiores a 100µM. (Buitrago & Tenjo, 2007)



### 1.5.1.3. Inhibidores de crecimiento

Entre los elementos inhibidores se tienen la plata, arsénico, bario, litio, níquel, osmio, plomo, selenio y telurio. (Cáceres & Reyna. 2002)

El inositol juega un papel importante en la síntesis de los lípidos de las membranas.

El pantotenato es un factor de crecimiento para *Saccharomyces* y debe presentarse en el medio en forma de pantotenato de calcio a una concentración de alrededor de 6.25 mg/L.

La vitamina B6 o piridoxina es transformada en fosfato de piridoxal y en piridoxamina, coenzimas implicadas en la desaminación y descarboxilación de los aminoácidos.

La tiamina (vitamina B1) tiene un papel en el metabolismo respiratorio, el metabolismo de los lípidos, la glucólisis y la fermentación alcohólica. Las necesidades para *S. cerevisiae* son alrededor de 5 mg/L de tiamina.

La biotina es un factor de crecimiento para las levaduras. Está implicada en numerosas reacciones anabólicas: carboxilación del piruvato, síntesis de las bases púricas y pirimídicas, de los nucleótidos y de los ácidos nucleicos, síntesis de las proteínas, de los polisacáridos y de los ácidos grasos. Las necesidades de biotina son del orden de 1mg/L para *S. cerevisiae*. Las otras vitaminas, ácido fólico, ácido p-amino benzoico y riboflavina son normalmente sintetizadas por las levaduras. (Buitrago & Tenjo, 2007)

### 1.5.1.4. Requerimientos físico-químicos

A pesar de la tolerancia bastante amplia de *S. cerevisiae* el crecimiento es favorecido a un pH próximo a 4.0 – 5.0 y no se desarrollan bien en medio alcalino a menos que se hayan adaptado al mismo. El medio ácido influye en el crecimiento celular, producción enzimática y utilización de glucosa por parte de la levadura. Así por ejemplo, algunas investigaciones han observado que con un pH inicial entre 4.0



y 4.5 se obtiene mejor crecimiento y utilización de glucosa, mientras que la máxima producción de enzima se observa a un pH de 3.0. (Fajardo & Sarmiento, 2007)

#### **1.5.1.5. Tolerancia al etanol**

No todas las levaduras presentan la misma tolerancia al etanol, siendo las más resistentes las especies de *Saccharomyces sp* por lo que son empleadas en los procesos de fermentación alcohólica para la elaboración de bebidas o la producción industrial de etanol. Según las cepas y el estado fisiológico del cultivo, el etanol es tóxico en concentraciones del 8% (p/v) al 18% (p/v). La tolerancia al etanol depende de la composición en ácidos grasos de las membranas citoplasmáticas. Las células cultivadas en presencia de ácido linoleico (C18:2) toleran mejor el etanol añadido al medio que las células en presencia de ácido oleico (18:1). La viabilidad es mejor en presencia de ergosterol que de camposterol.

El etanol intracelular es más tóxico para las células que el etanol extracelular. La viabilidad de los cultivos puede incrementar por la eficiencia de la excreción del etanol, debido a esto cuando la presión osmótica aumenta en el medio, la secreción del etanol se disminuye considerablemente. En un medio que contiene 30% (p/v) de sorbitol y 10% (p/v) de sacarosa, no hay prácticamente ninguna secreción del etanol durante 24 horas mientras que en un medio con presión osmótica baja, el etanol difunde rápidamente. Las medidas de etanol intracelular permiten situar el umbral de toxicidad hacia 0.25 mg de etanol intracelular para 10<sup>6</sup> células viables. Es así que, la presión osmótica elevada de los medios representa un problema importante en la fermentación alcohólica, que debe ser tenido en cuenta en el proceso de producción de etanol. (Buitrago & Tenjo, 2007)



## CAPITULO 2

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 MÉTODOS

##### 2.1.1. DISEÑO Y TIPO DE INVESTIGACIÓN

- **Tipo:** Analítico –Cuantitativa.
- **Nivel:** Correlacional
- **Diseño:** Cuasi - Experimental.
- **Tipo de estudio:** Transversal

Se define a esta investigación como Analítico – Cuantitativa de nivel Correlacional, debido a que se expondrán los resultados cuantificados de los análisis realizados a los diferentes grupos de estudio en forma estadística, preparando tablas y gráficos de los valores obtenidos por cada cepa de levadura.

El diseño del presente trabajo fué de tipo Cuasi-Experimental de corte Transversal, pues se midió la capacidad fermentativa de las cepas de levadura manipulándose el tipo de levadura, pero trabajando con un lote de jugo de agave seleccionado por conveniencia y las mediciones se realizaron en una sola ocasión.

##### 2.1.2. ZONA DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó en la planta de procesamiento de tequila Trancahuaico ubicada en el cantón de San Felipe de Oña. Se localiza a 102 Km. al suroeste de la ciudad de Cuenca.





### 2.1.3. TEMPERATURA Y EXTENSIÓN

El Cantón Oña tiene una superficie de 298 km. En este sector se registra una temperatura de 15°C en invierno y presenta una estación de lluvias de Enero a Mayo; llegando hasta los 28°C en verano soleado, con cielos despejados.

### 2.1.4. ALTITUD

El terreno de Oña es bastante accidentado y se eleva entre los 2260 m.s.n.m. por lo que presenta una diversidad de pisos climáticos que van desde páramos y bosques secundarios en las partes altas, hasta pequeños valles calientes en las zonas bajas junto a los ríos.

## 2.2. MUESTREO Y TAMAÑO DE LA MUESTRA

### 2.2.1 TIPO DE MUESTREO

En el presente estudio se aplicó un muestreo probabilístico por conveniencia con el fin de obtener muestras representativas del jugo de agave del lote disponible para los diferentes análisis, y del fermento artesanal utilizado para la producción alcohólica.

### 2.2.2. MUESTREO PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL FERMENTO

Con el fin de caracterizar las levaduras presentes en la materia prima del lugar de estudio, se tomó 3 muestras del jugo de agave al momento de su llegada a la fábrica y 3 muestras después de terminada la fermentación. Además se tomó 1 muestra de fermento artesanal. El tamaño de cada muestra fue de 150 mL del jugo y fermento artesanal respectivamente, este proceso se lo realizó por triplicado

### 2.2.3. MUESTREO PARA LOS ENSAYOS DE FERMENTACIÓN Y DESTILACIÓN

Se tomaron 5 muestras por triplicado de 750 mL del jugo para ser fermentados con los 3 tipos diferentes de levaduras (Cepa de *Saccharomyces cerevisiae* del fermento artesanal, *Saccharomyces cerevisiae* Danstil EDV 493 y *Saccharomyces cerevisiae* ZWLDTY48). Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Alimentos y Nutrición



del Proyecto VLIR-IUC. Campus Balzaín. Se realizó una fermentación y una destilación a nivel de laboratorio con la levadura de mayor rendimiento alcohólico relativo.

## 2.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

### Criterios de inclusión:

- Jugos madurados durante 4 días.
- Jugos que cumplan las características organolépticas según la norma NMX-V-022-1972. Aguamiel. Hidromiel. Normas Mexicanas: color, olor, sabor, aspecto. (**Anexo 1**)
- Mezcla de jugos de un mínimo de 4 proveedores.
- Jugos que posean un mínimo de 5 °Brix.

### Criterios de exclusión

- Jugos que presenten sustancias extrañas (insectos, ramas, etc.).

## 2.4. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Para el muestreo se siguió la NTE INEN 1 529-2:99: Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el Análisis microbiológico (**Anexo 3**); tomando en cuenta las características organolépticas y la concentración de azúcares (°Brix) del jugo. Además se constató que el lote de jugo provenga de varios proveedores.

Una vez que se realizó este procedimiento se tomaron muestras de 150 mL y 750 mL del jugo, para los diferentes análisis en frascos estériles y etiquetados apropiadamente.

Las muestras recolectadas fueron transportadas inmediatamente al laboratorio para su análisis respectivo en condiciones refrigeradas (4-8°C). (**Ilustración 1**)

## 2.4.1. EXÁMEN FÍSICO

### 2.4.1.1. Características organolépticas

Se analizaron las características organolépticas del chaguarmishqui que llegó a la fábrica por parte de los proveedores.

Color: Debe tener un color ambarino, propio del producto.

Olor: Debe ser el característico del producto.

Sabor: El sabor del aguamiel debe ser dulce, sui géneris.

Aspecto: Debe tener aspecto traslúcido. (**Anexo 1**)

### 2.4.1.2. Concentración ° Brix

Para la medición de los grados Brix, se utilizó un refractómetro de luz. (**Figura 7**)

Previo a la medición, se filtró el jugo a través de un papel filtro.

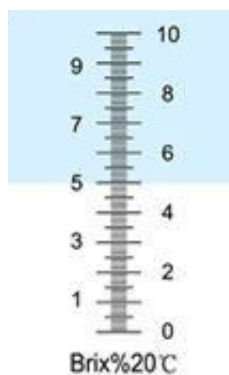


**Figura 8:** Refractómetro utilizado para medir los °Brix del chaguarmishqui  
Fuente: Autores

## Procedimiento

- Colocar el refractómetro en una posición tal que difunda la luz natural o cualquier otra forma de luz artificial que pueda utilizarse para iluminación. Limpiar cuidadosamente con alcohol y éter de petróleo el refractómetro antes de hacer la lectura.

- Para cargar el refractómetro abrir el doble prisma girando el tornillo correspondiente y poner unas gotas de muestra sobre el prisma, cerrar y ajustar finamente.
- Verificar la exactitud del refractómetro con agua a 20°C. A esta temperatura, el índice de refracción del agua es de 1.3330.
- Mover el brazo giratorio del aparato hacia delante y hacia atrás hasta que el campo visual se divida en dos partes, una luminosa y otra oscura. La línea divisoria entre esas dos partes, se le conoce como "línea margen". Ajustar la línea margen y leer directamente el por ciento de sólidos en la escala Brix. **(Figura 9) (Anexo 4).**



**Figura 9:** Refractómetro de jugo de fruta, del vino, etc.  
Fuente: ServoVendi

## **2.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL CHAGUARMISHQUI Y FERMENTO ARTESANAL**

Se preparó la muestra para el análisis atemperándola a 25 °C. Posteriormente se realizaron las diluciones 1/10 tomando 25 mL del chaguarmishqui con una pipeta estéril añadiéndolo a un erlenmeyer que contenía 225 mL del agua de peptona 0.1%. **(NTE INEN 1529-5: 2006)**

Se continuó con las diluciones tomando 1 mL de la primera dilución y colocándolo en tubos con 9 mL de agua de peptona al 0.1%, repitiendo el mismo procedimiento hasta obtener diluciones de  $10^{-4}$ . (Ilustración 2)

Una vez realizada las diluciones se sembró por agotamiento en placa en el medio Yeast pepton dextrose (YPD) con cloranfenicol al 1%.

### Procedimiento:

- Se toma la caja de Petri en la palma de la mano y ligeramente inclinada; con la mano contraria, se manipula el asa de argolla previamente esterilizada por flameado directo a la llama y con ella se recoge la dilución, para colocarlo en la periferia de la caja haciendo movimientos circulares para homogeneizar el inóculo.
- A continuación se realiza una estría partiendo de la primera y arrastrando los microorganismos presentes en ella hacia el extremo contrario de la superficie del agar. Se debe procurar que en cada sección de la caja, las estrías queden trazadas con mayor separación. **(Figura 9)**
- Se repite el paso anterior, por tres veces en el medio de cultivo y se incuba a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas y observamos el crecimiento. (Rojas, 2011)

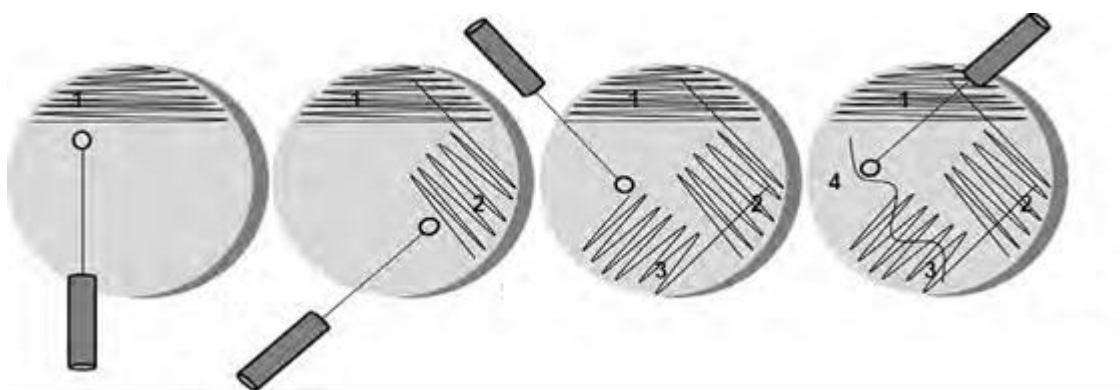


Figura 9: Siembra por agotamiento  
Fuente: Rojas. 2011

## 2.6. CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA *Saccharomyces cerevisiae* DEL FERMENTO ARTESANAL

Para la identificación de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* del fermento artesanal se observaron las características macroscópicas y microscópicas de las colonias en el medio de cultivo YPD, se realizaron prueba fermentativas, bioquímicas y de floculación. (Anexo 5).

**Tabla 7:** Pruebas de identificación de la *Saccharomyces Cerevisiae*  
Fuente: Martini & Col. 1992. A taxonomic key for the genus *Saccharomyces*.

Cepas de levaduras	Concentración de etanol (v/v)			Temperatura °C				Floculación	Producción de H <sub>2</sub> S
	10%	13%	15%	25	30	37	45		
SN1	+++	++	-	+++	+++	+++	+++	-	+
SKS2	+++	++	-	+++	+++	+++	+++	-	-
SNR3	+++	++	-	+++	+++	+++	+	-	+++
SB4	+++	++	-	+++	+++	+++	+	-	++
SM5	+	-	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT
SD6	++	+	-	+++	+++	++	-	-	+
STB7	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
SO8	++	+	-	+++	+++	++	-	-	+
SMK9	+++	++	-	+++	+++	++	-	+	++
SDB10	+++	++	-	+++	+++	++	-	+	++
SRB11	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	-	+
SS12	+++	+++	-	+++	+++	+++	-	-	+
SJ13	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	-	+
SK14	+++	+++	+	+++	+++	+++	-	-	-
SRT15	+++	+	-	+++	+++	+++	-	-	+
SM16	+++	++	-	+++	+++	+++	-	-	+++
SC	+++	++	-	+++	+++	+++	-	+	+++
Respuesta intensiva (+++); Respuesta moderada (++); Respuesta baja (+); Sin reacción (-) SC: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> comercial, como control NT: No probado									



### 2.6.1. TINCIÓN DE AZUL DE METILENO Y SUERO FISIOLÓGICO

Para la identificación microscópica de *Saccharomyces cerevisiae*, se utilizó un microscopio con lente de 40x. (Ilustración 3) (Ilustración 4)

Se colocó primero una gota de solución fisiológica sobre el portaobjeto. Luego, con asa metálica se tomó una colonia del medio YPD y se emulsionó.

Para realizar el extendido se repite el paso anterior y con ayuda de otro porta objetos se realizó el frotis.

Para la fijación se pasa lentamente el portaobjeto, en forma horizontal, sobre la llama del mechero manteniendo el extendido hacia arriba.

Una vez seco el extendido se colocó unas gotas de azul de metileno y se dejó actuar unos minutos.

Se eliminó el exceso de colorante lavando con agua de forma suave, con ayuda de piseta. Se secó el extendido a temperatura ambiente.

### 2.6.2. PRUEBAS FERMENTATIVAS

Se tomó con un asa metálica previamente esterilizada una colonia que tenga las características macroscópicas y microscópicas de la *Saccharomyces cerevisiae*, se inoculó en tubos que contienen una concentración de diferentes azúcares (glucosa, sacarosa, lactosa, galactosa) con un indicador de azul de bromotimol y una campana de Durham. Se incubó a 37°C durante 48 horas y se observó la fermentación y el cambio de color en los caldos. (Ilustración 8.5)

### 2.6.3. PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Se tomó con un asa de platino previamente esterilizada una colonia con las características macroscópicas y microscópicas de la *Saccharomyces cerevisiae*, se sembró por el método de la picadura y estriado en el medio de cultivo sulfito de bismuto.



Se incubó a 37°C durante 48 horas. Se observó la producción de sulfuro de color negro en el lugar donde se realizó la picadura. (**Ilustración 6**)

#### **2.6.4. FLOCULACIÓN**

Se tomó con un asa metálica previamente esterilizada una colonia que tenga las características macroscópicas y microscópicas de la *Saccharomyces cerevisiae*, se inoculó en tubos que contienen caldo YPD. (Asyikeen & Col, 2013)

Se observó la floculación propia de las levaduras. (**Ilustración 7**)

#### **2.7. AISLAMIENTO DE *Saccharomyces cerevisiae***

Las colonias que fueron identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* sufrieron una resiembra en otro medio de YPD, se incubó a 25 °C por 2 días, con la finalidad conservar las levaduras para su posterior uso.

#### **2.8. FERMENTACIÓN**

##### **2.8.1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE LA CEPA *Saccharomyces cerevisiae* DEL FERMENTO ARTESANAL**

Para la preparación del inóculo se tomaron colonias de *Saccharomyces cerevisiae* previamente identificadas y se los inoculó en el caldo YPD.

Para el cálculo del volumen a utilizar en la fermentación se tomó en cuenta que al ser la levadura aislada del jugo y del fermento artesanal utilizado en la fábrica se utilizó la relación de volúmenes de la fábrica (1/100), es decir: Se colocó 10 L de fermento por cada 1000 L de chaguarmishqui. (**Anexo 6**)

Para el caso del laboratorio se colocó por cada 100 mL de jugo 1 mL de caldo YPD de la suspensión de levaduras.





### **2.8.2. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE DANSTIL EDV 493**

Se pesó 0.75 g de la levaduras como lo indica la casa comercial (**Ilustración 8**), después fueron reconstituidas con un volumen de 15 mL agua destilada a 40°C. Se esperó que se active la levadura por un tiempo de 15 minutos. (**Anexo 6**)

### **2.8.3. PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE ZWLDTY48**

Se pesó 4 g de la levadura como lo indica la casa comercial (**Ilustración 9**) y luego fueron reconstituidas en un volumen 10 mL de una solución acuosa de azúcar al 10% a 30 °C. Se esperó 5 minutos para usar la levadura. (**Anexo 6**)

## **2.9. PROCESO DE FERMENTACIÓN EN EL LABORATORIO**

El proceso de fermentación se realizó por triplicado para cada una de las levaduras. La fermentación se realizó con muestras del jugo inoculadas con los diferentes volúmenes preparados de las levaduras para 750 mL cada uno. Se tuvo la precaución de que estos recipientes sean del mismo material del envase en donde se realiza la fermentación a nivel de la fábrica.

Las condiciones de fermentación fueron las mismas que en la fábrica: temperatura de 25 °C, control de pH a 3.5 y °Brix de 6.8, para evaluar empíricamente las características organolépticas del jugo al inicio y al final de la fermentación. (**Ilustración 10**). Además se realizó la prueba del CO<sub>2</sub> que consiste en acercar un fósforo encendido a la boca del recipiente, si éste se apaga es por la liberación de CO<sub>2</sub> por parte de las levaduras durante el proceso de fermentación, caso contrario este habrá terminado.

## **2.10. DESTILACIÓN EN EL LABORATORIO**

El tipo de destilación que se realizó en el laboratorio fué la destilación fraccionada, que consiste en usar una columna de fraccionamiento que contiene pequeños platos distribuidos a lo largo de su longitud, de forma que las pequeñas cantidades



de líquido que se encuentran en cada una de ellas, durante el proceso de la destilación, contienen mezclas cada vez más enriquecidas en el líquido más volátil.

**(Ilustración 13)**

Se colocaron 500mL de mosto en el balón de destilación, y se calentó hasta que la temperatura alcance 75 °C. Se recogieron los primeros mililitros que conforman la cabeza del aguardiente y contienen un grado alcohólico alto. Al alcanzar los 80°C hasta 85°C se recogió el cuerpo a una concentración de 45 % v/v. Finalmente al incrementarse la temperatura bruscamente y observar la baja del grado alcohólico se dió por terminada la destilación. Esta operación tuvo una duración de 50 minutos aproximadamente. Al final de este estudio se seleccionó la levadura que mejor rendimiento presentó para realizar el siguiente ensayo a nivel de la fábrica.

## **2.11. PROCESO DE FERMENTACIÓN Y DESTILACIÓN EN LA FÁBRICA**

Una vez seleccionada la levadura del laboratorio con mejor rendimiento, se realizó el ensayo en la fábrica, añadiendo dicha levadura a un tanque que poseía 330 litros de chaguarmishqui (**Ilustración 11**) (**Ilustración 12**), y conjuntamente se llevó una muestra de 750 mL chaguarmishqui para realizar la fermentación en el laboratorio al mismo tiempo, midiendo valores de grados Brix. (Anexo 7)

El proceso de fermentación se llevó a cabo durante 48 horas.

En la Fábrica Trancahuaico la destilación se realizó en un alambique de cobre, de una capacidad de 330 litros aproximadamente.

El mosto se demoró 2 horas hasta el momento en que cayó la primera gota del destilado. Se recogió un litro aproximadamente de cabeza del destilado, que a su vez fue separado del cuerpo.

El cuerpo fue recolectado hasta obtener una concentración de 45 % v/v de etanol, teniendo así el tequila como producto final. Todo el proceso duró alrededor de 4 horas.



La destilación del ensayo se lo realizó una vez terminada la fermentación en la fábrica, realizándose al mismo tiempo la destilación en el laboratorio. (Anexo 7)

## 2.12. CÁLCULO DEL RENDIMIENTO ALCOHÓLICO

El rendimiento alcohólico es la comparación de los gramos de etanol teóricos con los gramos de etanol obtenidos de la fermentación. Esto se lo logra realizando un control de la cinética de fermentación es decir midiendo la concentración de azúcares totales al inicio, durante y final de la fermentación, además de realizar la destilación de los mostos tequileros adecuadamente evitando la pérdida de etanol.

Una alternativa para la medición del rendimiento alcohólico se puede realizar en base a la metodología de superficie de respuesta (MSR) que considera el volumen de tequila producido, las características organolépticas y la calidad del tequila en base al análisis bromatológico. (Mora & Luna, 2012)

Considerando que el jugo utilizado en el presente estudio no fue pasteurizado una vez extraído por los proveedores y además sufrió un proceso de fermentación por la flora microbiana natural durante 4 días antes de llegar a la fábrica, se optó por calcular un rendimiento alcohólico relativo que se obtuvo comparando el volumen de etanol obtenido y el volumen de mosto tequilero, tomando como referencia el estudio que se lo realizó en la Universidad de Guadalajara, Zapopan Jalisco. México, donde por cada 700 mL de mosto muerto se recupera 200 mL de tequila ordinario. (Mora & Luna, 2012)

La relación para el estudio es la siguiente:

$$\begin{array}{ccc} 700 \text{ mL de mosto} & & 100\% \\ & \searrow & \\ 200 \text{ mL de tequila} & & 28.57\% \end{array}$$

Por lo tanto, en esta relación, el rendimiento alcohólico relativo del volumen total de tequila obtenido después de la fermentación a partir de mosto es 28.57%. (Mora & luna, 2012)



## 2.13. MATERIALES

### 2.13.1. EQUIPOS Y MATERIALES

- Cooler para transporte de muestras
- Lámparas de alcohol
- Erlenmeyer
- Asa Calibrada
- Asa Recta
- Cajas Petri
- Tubos Tapa rosca
- Estufa a 37°C y 25 °C
- Placas Portaobjetos
- Gradillas para tubos
- Balón de destilación
- Refrigerante
- Mangueras
- Probetas
- Vasos de precipitación
- Soporte metálico
- Pinzas



## 2.13.2. TINCIONES

### 2.13.2.1. Azul de metileno

- **Fundamento:**

El azul de metileno es un buen colorante simple que actúa sobre todas las células bacterianas rápidamente y que no produce un color tan intenso que oscurezca los detalles celulares. Es especialmente útil para detectar la presencia de bacterias en muestras naturales, puesto que la mayor parte del material no celular no se tiñe. (AcuaNatura, 2007).

El azul de metileno permite teñir el interior celular. Tiñe microorganismos procarióticos (vivos o muertos), mientras que los eucarióticos sólo se tiñen si están muertos. Algunas estructuras, como los corpúsculos metacromáticos, se tiñen más intensamente con este colorante que el resto de la célula. La actividad reductora de las células de levadura viables transforma el azul de metileno en un derivado incoloro. Las células de levadura muertas se tiñen de azul. (Castellucci, 2010)

- **Tinción:**

En una placa realizar el extendido de las colonias del medio de cultivo, colocar un volumen del azul de metileno hasta cubrir el extendido, esperar 2-3 minutos y lavar la placa, finalmente observar al microscopio.

## 2.13.3. MEDIOS DE CULTIVOS

### 2.13.3.1. Medio Yeast pepton dextrose (YPD)

**Fundamento:**

Este es un medio de uso rutinario que aporta todos los nutrientes necesarios para que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* crezca. Se compone de extracto de levadura 1% (p/v), bactopectona 2% (p/v), y como fuente de carbono: glucosa al



2% (p/v) (medio rico YPD). Y en algunos casos, galactosa al 1% (p/v) (medio de inducción YP 1% D,1% Gal). Las placas de medio sólido contienen 2% (p/v) de agar bacteriológico. (Latorre, 2008)

- **Siembra:**

Con un asa redonda tomar la muestra a analizar y sembrar por agotamiento sobre la placa del medio solidificado.

- **Incubación:**

Incubar a 25 °C por 48 horas.

### **2.13.3.2. Agua de peptona**

- **Fundamento:**

Es un medio utilizado como diluyente y para el enriquecimiento bacteriano a partir de alimentos y otros materiales de importancia sanitaria.

Es un medio de enriquecimiento no selectivo, en el cual la peptona proporciona nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Permite recuperar células dañadas por procesos fisicoquímicos a los que ha sido sometido el alimento.

Además puede ser utilizado como diluyente de muestras en reemplazo de solución fisiológica y como medio base para la fermentación de hidratos de carbono. En este último caso se debe adicionar el indicador de Andrade y el hidrato de carbono en cuestión en concentración final al 1%. (Britania, 2002)

### **2.13.4. PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

Las pruebas bioquímicas se han desarrollado para demostrar en forma clara las características bioquímicas de los hongos y bacterias tales como la presencia o



ausencia de enzimas, la facilidad de crecimiento en diferentes condiciones nutricionales y de temperatura, etc.

Estas pruebas utilizan diferentes métodos de trabajo (caldos de cultivo, medios de cultivo, indicadores, inhibidores, marcadores, etc.), cada uno de ellos pueden ser para un mismo microorganismo para comprobar su identidad, aislarlo, etc.

#### 2.13.4.1. Agar bismuto sulfito

- **Fundamento**

Es una modificación del Medio Wilson Blair, utilizado para la detección de *Salmonella*, en particular *Salmonella typhi* de muestras clínicas.

Esta prueba fue tomada del estudio de la Universidade Federal de Ouro Preto, Brasil del año 2008, en el cual se identificó a la *Saccharomices cerevisiae* con el uso del medio de este medio de cultivo.(Oliveira & Col)

La peptona y el extracto de carne aportan nitrógeno, vitaminas, minerales y amino ácidos esenciales para el crecimiento. La dextrosa es el carbohidrato fermentable y provee de carbono y energía.

En este medio el sulfito de bismuto actúa con el verde brillante como agente selectivo para la inhibición de coliformes, permitiendo el desarrollo de *Salmonella*.

Los compuestos de azufre funcionan como sustrato para la producción de ácido sulfhídrico, mientras que la reducción de las sales de bismuto a bismuto metálico tiñe las colonias de un brillo negro o café metálico por la reducción del sulfito a sulfuro, produciendo ácido sulfhídrico.

Las colonias sulfhídrico positivas presentan ennegrecimiento debido al sulfuro de hierro. La reducción de los iones bismuto a bismuto metálico produce brillo metálico alrededor de las correspondientes colonias, que suele aparecer a las 48 h de incubación. El agar bacteriológico es el agente solidificante. (Condalab, 2010)



El efecto diferenciador se basa en el siguiente mecanismo: las colonias de gérmenes muy reductoras presentan una elevada presión de electrones en su interior, que disminuye hacia afuera, por lo tanto, en el centro de esas colonias se reduce el sulfato y el sulfito a sulfuro, lo cual se denota por un ennegrecimiento a sulfuro de hierro. En los alrededores, sin embargo, no es posible más que una reducción de los iones bismuto a bismuto metálico, lo cual da lugar a la aparición de un brillo metálico alrededor de las colonias. (Condalab, 2010)

- **Siembra:**

Sembrar el medio de cultivo, picando el fondo y extendido sobre la superficie del medio.

- **Incubación:**

A 25 – 35 °C durante 48 horas.

#### **2.13.4.2. Pruebas de Fermentación**

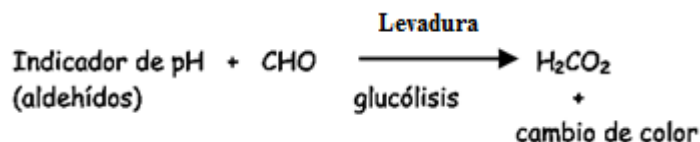
- **Fundamento:**

Las pruebas de fermentación de carbohidratos son útiles para complementar los resultados de las pruebas de utilización de los hidratos de carbono cuando existe alguna dificultad para la identificación definitiva de un organismo.

Los medios de fermentación contienen peptona, extracto de ternera o de levadura, un indicador y fuentes de carbohidratos individuales. La fermentación se detecta únicamente por la producción de gas. La producción de ácidos, como indica el cambio de color del indicador, no es indicio de fermentación. (Castillo, 2012.)

La degradación de distintos azúcares por distintas vías metabólicas produce ácido o gas. El ácido se detecta por el viraje al amarillo del indicador rojo fenol, y el gas por la formación de burbujas que quedan atrapadas en la campana Durham.





La batería de pruebas de fermentación para la identificación de la *Saccharomices cerevisiae* se basan en el comportamiento de las especies del género *Saccharomyces* frente a los azúcares. (Vaughan-Martini & Martini, 1993)

- **Siembra:**

Sembrar el caldo de cultivo, utilizando un asa redonda tomando colonias de medio de cultivo.

- **Incubación:**

A 25 °C durante 48 horas.

- **Interpretación:**

Prueba positiva: color amarillo con o sin gas.

Prueba negativa: color rojo con ausencia de gas.

### 2.13.5. PRUEBA DE LA FLOCULACIÓN

- **Fundamento:**

La floculación de las levaduras es un proceso reversible en el cual las células se adhieren para formar flóculos de cientos de células y depende del ión  $\text{Ca}^{2+}$  (Bony et al., 1997).

La floculación se debe a la presencia de lectinas específicas (floculinas) en las paredes celulares de las levaduras floculantes que se adhieren selectivamente a los residuos de manosa presentes en la pared celular de células adyacentes. El ión  $\text{Ca}^{2+}$  es necesario para activar la floculina. (Ferreira, 2006)



- **Siembra:**

Sembrar el caldo de cultivo, utilizando un asa redonda tomando colonias de medio de cultivo.

- **Incubación:**

A 25 °C durante 48 horas.

## 2.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron análisis descriptivos de los resultados. Las diferencias entre las variables de la destilación (volumen inicial, volumen final, cabeza, cuerpo, cola, pérdida y rendimiento alcohólico) a partir de los 3 diferentes fermentos fueron evaluadas utilizando el análisis de varianza (ANOVA). Para la identificación del fermento con mejor respuesta a las variables indicadas se realizó por medio de la prueba Scheffe (post-hot pairwise comparison). El nivel de significancia ( $\alpha$ ) establecido fue  $P < 0.05$  para todos los análisis.

El análisis de los datos se realizó en el programa Stata 10.0 (Stata Corporation, College Station, TX).

## CAPITULO 3

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 3.1. RESULTADOS DEL ANÁLISIS A NIVEL DEL LABORATORIO

## 3.1.1. Análisis organoléptico del chaguarmishqui

Para el inicio del estudio se analizaron las características organolépticas del chaguarmishqui de los proveedores al inicio y al final de la fermentación.

**Tabla 8:** Características del jugo antes y después de la fermentación obtenidas en el desarrollo de la investigación.

Características organolépticas del chaguarmishqui de los proveedores	
COLOR:	Ámbar
OLOR:	Dulce
SABOR:	Sui generis
ASPECTO:	Translúcido

### 3.1.2. Análisis Microbiológico del Chaguarmishqui y el Fermento artenasal: Identificación de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae*

El análisis microbiológico se realizó por triplicado en el chaguarmishqui recolectado por la Fábrica Trancahuaico, además se realizó el análisis del fermento artesanal.

**(Tabla 9)**

Para la identificación de la *Saccharomyces cerevisiae* del chaguarmishqui y el fermento artesanal se realizaron prueba fermentativas, bioquímicas y de floculación. Los resultados de estas pruebas se presentan en la **Tabla 9**. En donde se confirmó la presencia de *Saccharomyces cerevisiae*.

**Tabla 9.** Pruebas de identificación de la *Saccharomyces cerevisiae* en el Chaguarmishqui y el fermento artesanal de la Fábrica Trancahuaico.

PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN															
PRODUCCIÓN DE HIDROGENO SULFURADO															
	Jueves			Viernes			Lunes			Martes			Fermento artesanal		
	CJ1	CJ2	CJ3	CV1	CV2	CV3	CL1	CL2	CL3	CM1	CM2	CM3	F1	F2	F3
Medio Sulfito Bismuto	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
FLOCULACIÓN															
Caldo YPD	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
PRUEBAS DE FERMENTACIÓN / PRODUCCIÓN DE GAS															
Galactosa	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Fructosa	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Sacarosa	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Maltosa	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Interpretación: C= chaguarmishqui, J= Jueves, V= Viernes, L= Lunes, M= Martes, F= Fermento artesanal.															

### 3.1.2. Evaluación del proceso de Fermentación

Una vez demostrada la presencia de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* en el chaguarmishqui y el fermento artesanal, se procedió a la fermentación comparativa con las otras levaduras comerciales.

Para ello se recolectaron las muestras de un lote para mantener las mismas condiciones de nutrientes presentes en el chaguarmishqui, el tiempo de maduración y la carga microbiana inicial, con la medición de pH y °Brix. **(Tabla 10)**  
**(Anexo 8)**

**Tabla 10:** Evaluación del proceso de fermentación de las levaduras comerciales y silvestre utilizando chaguarmishqui recolectado en la Fábrica Trancahuaico.

Levadura	<i>S. cerevisiae</i> silvestre	Danstil EDV 493	<i>S. cerevisiae</i> ZWLDY48
Inicio de la Fermentación			
°Brix	6,8	6,8	6,8
pH	3,5	3,5	3,5
Fin de la Fermentación			
°Brix	4,4	4,2	4
pH	3	3	3

Al punto final de la fermentación los valores de pH disminuyeron ligeramente y de manera similar para todas las levaduras, mientras que una disminución considerable de °Brix se presentó en la fermentación con la *S. cerevisiae* ZWLDY48. Esto indica que hubo un mayor consumo de azúcares solubles del chaguarmishqui; y por lo tanto se podría sugerir que el proceso de fermentación fue más eficiente con esta levadura. (Josafad & Col, 1998)

Sin embargo, se debe considerar que la diferencia entre la concentración de azúcares entre las cepas de levaduras estudiadas no se debe sólo a la presencia de dichas levaduras, sino que también puede deberse a la carga microbiana elevada presente en el chaguarmishqui. Por lo tanto tampoco fue posible medir la cantidad exacta de azúcar que fue consumida por cada levadura.

### 3.1.3. Evaluación del proceso de Destilación

Una vez finalizada la fermentación se procedió a realizar la destilación fraccionada en la cual se separó la cabeza, cuerpo y cola según las especificaciones volumétricas de la fábrica. (**Tabla 11**) (**Anexo 9**)

**Tabla 11:** Resultados obtenidos en la destilación a nivel del laboratorio de las diferentes levaduras estudiadas con un Volumen inicial de 500 mL de chaguarmishqui.

	<b>S.c. Silvestre</b>	<b>S.c. DANSTIL EDV 493</b>	<b>S.c. ZWLDTY48</b>	<b>Valor de P</b>
<b>V0 (mL)</b>	500	500	500	-
<b>V1 (mL)</b>	448,1 ± 0,2	440,3 ± 0,7	436,2 ± 0,8	<0,001
<b>Cabeza (mL)</b>	1	1	1	-
<b>Cuerpo (mL)</b>	44,0 ± 0,7	51,6 ± 1,1	56,0 ± 0,7	<0,001
<b>Cola (mL)</b>	4,5 ± 0,5	5,1 ± 0,2	4,7 ± 0,4	0,998
<b>Pérdida (mL)</b>	2,2 ± 0,3	2,2 ± 0,8	2,2 ± 0,4	0,087
<b>Rendimiento (%)</b>	8,8 ± 0,1	10,3 ± 0,2	11,2 ± 0,1	<0,001
Interpretación: V0 = Volumen Inicial, V1 = Volumen Final				

La concentración del tequila producido en la fábrica Trancahuaico es de 45 %v/v de etanol, por lo que la destilación a nivel de laboratorio terminó cuando el cuerpo del destilado alcanzó dicha concentración.

Los volúmenes del destilado obtenidos con cada uno de los fermentos, fueron comparados utilizando el análisis de varianza (ANOVA). En base a estos resultados, se observaron diferencias significativas entre los 3 fermentos con respecto al volumen final ( $P<0.001$ ), al cuerpo ( $P<0.001$ ) y al rendimiento alcohólico ( $P<0.001$ ).

Con la finalidad de identificar la diferencia entre los 3 fermentos, se utilizó la prueba de Scheffe. Según esta prueba, para el volumen final la *S. cerevisiae* Danstil EDV 493 fue 7.84 veces menor al de la cepa *S. cerevisiae* del fermento artesanal y 4.1 veces mayor a la *S. cerevisiae* ZWLDTY48. Por lo tanto, el volumen mayor residual que quedó de la destilación fue aquel obtenido con la cepa *S. cerevisiae* del fermento artesanal.



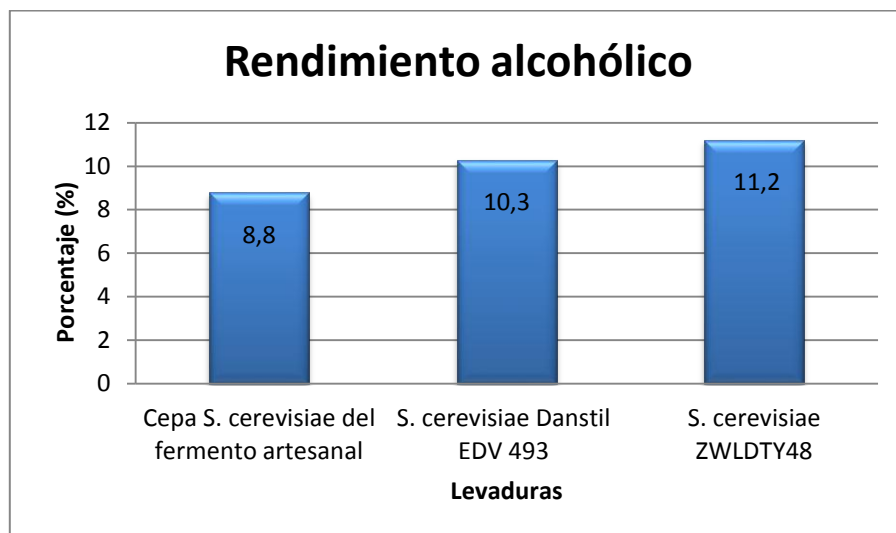
Considerando que el objetivo del presente estudio fué determinar el porcentaje de rendimiento alcohólico de cada una de las levaduras estudiadas, el producto final de la fermentación terminó al alcanzar 45% v/v de etanol, es decir, la concentración se mantuvo constante y solo varía el porcentaje de rendimiento relativo.

Según el análisis ANOVA, existió una diferencia significativa entre los volúmenes de cuerpo de los tres fermentos ( $p < 0.001$ ). En base a la prueba Scheffe, el volumen del cuerpo de la *S. cerevisiae* Danstil EDV 493 fue 7.6 veces mayor que la cepa *S. cerevisiae* del fermento artesanal ( $P < 0.001$ ) y 4.1 veces menor que la *S. cerevisiae* ZWLDTY48 ( $P < 0.001$ ). Por lo tanto, con la *S. cerevisiae* ZWLDTY48 se obtuvo el mayor volumen de cuerpo en la destilación ( $56,0 \pm 0,7$  mL).

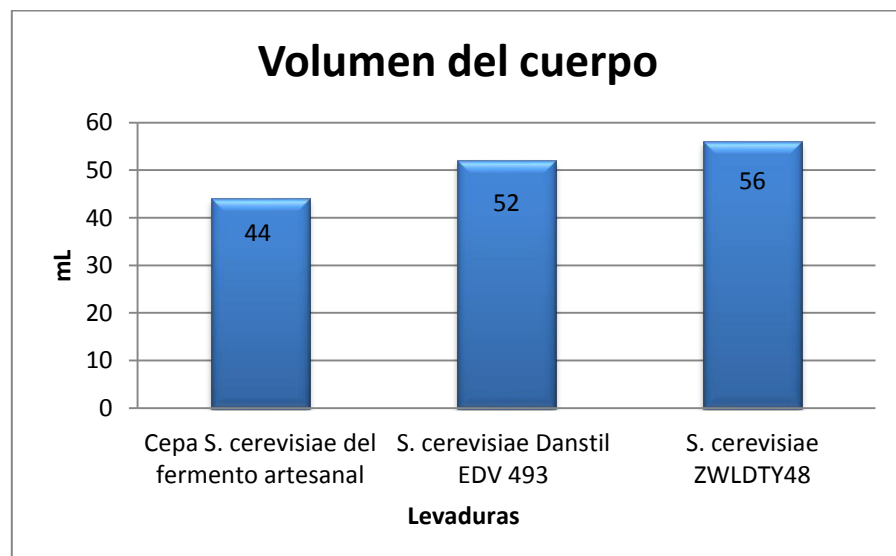
De igual manera, existió una diferencia significativa entre los rendimiento alcohólicos relativos de los tres fermentos ( $P < 0.001$ ). El rendimiento alcohólico relativo obtenido para la *S. cerevisiae* ZWLDTY48 fue el mayor ( $11,2 \pm 0.1\%$ ), el cual fue 0.88 veces mayor que la *S. cerevisiae* Danstil EDV 493 ( $P < 0,001$ ) y ésta a su vez fue 1.52 veces mayor que la cepa *S. cerevisiae* del fermento artesanal ( $P < 0,001$ ).

En el **Gráfico 3.1.1** y **3.1.2** se realiza una comparación del rendimiento alcohólico relativo y el volumen del cuerpo obtenidos por las tres levaduras, con la finalidad de valorar la capacidad de fermentación.

**Gráfico 3.1.1:** Rendimiento alcohólico relativo (%) obtenido para cada una de las levaduras estudiadas a nivel de laboratorio.



**Gráfico 3.1.2:** Volumen de cuerpo (mL) obtenido a partir de la fermentación con cada una de las levaduras estudiadas a nivel de laboratorio



Es importante indicar que al igual que el consumo de azúcares, el rendimiento alcohólico no se debe exclusivamente a las levaduras inoculadas. Además se debe considerar la posible presencia de bacterias productoras de etanol. (Garzón & Hernández, 2009). Por este motivo, en el presente estudio se calculó el rendimiento alcohólico relativo tomando como referencia el estudio realizado por



Mora & Luna, 2012 cuya metodología fue la más próxima al procedimiento que se realiza en la Fábrica Trancahuaico.

### 3.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS A NIVEL DE LA FÁBRICA

Tanto el volumen de etanol, como el rendimiento alcohólico fueron mayores cuando la fermentación se llevó a cabo con *S. cerevisiae* ZWLDTY48. Por lo tanto el estudio de fermentación en la fábrica se lo realizó con esta levadura, y simultáneamente se realizó otra con el fermento artesanal.

Con fines comparativos, la fermentación también se realizó a nivel de laboratorio utilizando el mismo lote de chaguarmishqui con la cepa de *S. cerevisiae* ZWLDTY48. La destilación se realizó conjuntamente el mismo día.

**Tabla 3.2.1:** Comparación de la destilación a nivel de la fábrica y en el laboratorio al mismo tiempo, usando la levadura comercial ZWLDTY48 y el fermento artesanal.

	Destilación en laboratorio	Destilación en la fábrica	Destilación en la fabrica
Fermento	ZWLDTY48		Fermento artesanal
	Mililitros	Litros	Litros
<b>V0 (mL)</b>	500	330	330
<b>Cabeza (mL)</b>	1	2	1
<b>Cuerpo (mL)</b>	52	32	28
<b>% v/v</b>	45	45	45
<b>Cola (mL)</b>	5	6	2
<b>Rendimiento (%)</b>	10,3	9,7	8,5

La mayor diferencia observada en la destilación a nivel de la fábrica fue el volumen en la cola. Durante la destilación al separar la cola del cuerpo la medición del volumen de la cola inició cuando se alcanzó un grado alcohólico de 38 % v/v de etanol recolectándose alrededor de 6 litros al utilizar la levadura comercial



ZWLDTY48 a diferencia de la cola de la destilación obtenida a partir del fermento artesanal (2 litros).

En base a estos resultados, el rendimiento alcohólico de la cepa *S. cerevisiae* ZWLDTY48 a nivel de la fábrica fue de 15% menor al obtenido a nivel de laboratorio, pero se mantuvo mayor al obtenido utilizando el fermento artesanal (12%).

La diferencia en el rendimiento alcohólico observado entre la fábrica y el laboratorio puede deberse a la diferencia de volumen utilizado en el ensayo y también al tipo de material en el cual se realizó la destilación (vidrio en el laboratorio y cobre en la fábrica) lo que puede llevar a pérdidas o ganancias en el proceso.

Es importante destacar que a nivel de laboratorio se utilizó la cepa *S. cerevisiae* del fermento artesanal previamente purificada. A partir de esta levadura se obtuvo un rendimiento alcohólico de 8.8% a nivel de laboratorio, y con el fermento artesanal a nivel de fábrica se obtuvo un rendimiento de 8.5 %. Por lo tanto esta diferencia (3.5% menor a nivel de fábrica) no fue tan considerable como la obtenida con la *S. cerevisiae* ZWLDTY48.



#### 4. CONCLUSIONES

Se obtuvo una diferencia significativa entre los rendimientos alcohólicos relativos de los tres fermentos ( $p < 0.001$ ).

El rendimiento alcohólico relativo obtenido para la *S. cerevisiae* ZWLDTY48 se caracterizó con un consumo más acelerado de los azúcares presentes en el chaguarmishqui y por lo tanto esto favoreció a una mayor producción de etanol. Así, dicha cepa fue la que presentó el mejor rendimiento alcohólico ( $11,2 \pm 0.1\%$ ), resultado 0.88 veces mayor que la *S. cerevisiae* Danstil EDV 493 ( $P < 0,001$ ) y ésta a su vez fue 1.52 veces mayor que la cepa *S. cerevisiae* del fermento artesanal ( $P < 0,001$ ).

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* ZWLDTY48 representa una mejor opción para el proceso de producción de tequila en términos comerciales.

Los resultados obtenidos con esta levadura a nivel de laboratorio se reprodujeron a nivel de la fábrica.

## 5. RECOMENDACIONES

Este estudio fue realizado con el apoyo de la Fábrica de tequila Trancahuaico, por lo que se recomienda:

- La recolección del jugo de los proveedores deberá ser pasando un día para evitar un mayor desarrollo de los microorganismos.
- Realizar un proceso de pasteurización con el fin de eliminar los microorganismos que puedan afectar la buena conservación del aguamiel, brindando estabilidad microbiológica y asegurando los nutrientes para el desarrollo de la levadura.
- Utilizar la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ZWLDTY48 la cual mejoraría el rendimiento alcohólico. En su defecto, el fermento artesanal debería ser renovado constantemente para asegurar la presencia de la levadura activa.
- En el caso del rendimiento alcohólico se recomienda implementar mejores técnicas de análisis de los azúcares, con el fin de evaluar el proceso de fermentación y validar la medición relativa del rendimiento alcohólico.

Para la continuidad del control de calidad en base al presente estudio se recomienda:

- Realizar la caracterización e identificación de *Saccharomyces cerevisiae* de la planta de agave, para confirmar la presencia de la levadura como nativa de la planta, con su posterior aislamiento.
- Pasteurizar el chaguarmishqui, para asegurar que el consumo de glucosa es realizado por las levaduras, y efectuar la mediciones de los azúcares presentes en el jugo.
- Optimizar el proceso de destilación a nivel de fábrica.



## 6. REFERENCIAS

1. Abisai, García. Los agaves de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Septiembre, 2007. [Fecha de Consulta 18/12/2013]. Disponible en: <http://www.revistaciencias.unam.mx/images/stories/Articles/87/02/Los%20agaves%20de%20Mexico.pdf>
2. Academia mexicana de tequila. Acamex tequila. El agave. 2001. [Fecha de Consulta 18/12/2013]. Disponible en: <http://www.acamextequila.com.mx/amt3/elagave.html>
3. Acosta Romero Carolina. Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en ingeniería química. Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ingeniería. Bogotá, Colombia 2012. [Fecha de Consulta: 29/12/2013]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/9933/1/300060.2012.pdf>
4. AcuaNatura. Técnicas de tinción. 2007. [Fecha de Consulta 12/06/2013]. Disponible en: <http://acuanatura.galeon.com/cursosonline/tecnicasdetincion/tecnicasdetincion.pdf>
5. Alberto Rojas-Triviño. Conceptos y práctica de microbiología general. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira 2011. VERSIÓN: 0.0. [Fecha de Consulta 07/01/2014]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/4999/1/albertorojatrivino.2011.pdf>
6. Allauca Salguero Rosa Elizabeth. Diversificación del uso del chaguarmishqui en la gastronomía del cantón Guano. 2010. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Salud Pública. Escuela de gastronomía. Riobamba, Ecuador. 2011. [Fecha de Consulta 18/12/2013]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/2324>

7. Andrade Paulette, Carrasco Karen, García Judith, Herrera Carla. Aislamiento, selección, conservación de los microorganismos aislados de la elaboración de vino de araza. Universidad de San Carlos de Guate. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Químicas. Escuela Bioquímica y Farmacia. [2010-2011]. [Fecha de Consulta 19/05/2013]. Disponible en:  
[https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0CDcQFjAD&url=http%3A%2F%2Fjudithv.wikispaces.com%2Ffile%2Fview%2FPROYECTO%2BVINO%2BDE%2BARAZA.docx&ei=0kCoUbucJYW C9gSosYDgBw&usg=AFQjCNFE7\\_dDv1xuZ3SQXfHZ-HXir3shCg&bvm=bv.47244034,d.eWU&cad=rja](https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0CDcQFjAD&url=http%3A%2F%2Fjudithv.wikispaces.com%2Ffile%2Fview%2FPROYECTO%2BVINO%2BDE%2BARAZA.docx&ei=0kCoUbucJYW C9gSosYDgBw&usg=AFQjCNFE7_dDv1xuZ3SQXfHZ-HXir3shCg&bvm=bv.47244034,d.eWU&cad=rja)
8. Beitia Samudio Jorge Luis. Proyecto de grado para optar al título de Ingeniero de producción agroindustrial. Influencia del subcultivo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en el desarrollo de una fermentación alcohólica. Universidad de la Sabana. Facultad de ingeniería. Programa de producción agroindustrial Bogotá, D.c. 2001. [Fecha de Consulta: 29/12/2013]. Disponible en:  
<http://intellectum.unisabana.edu.co:8080/jspui/bitstream/10818/5079/1/130020.pdf>
9. Buitrago Estrada Johanna Carolina & Tenjo Camacho Olly Giselle. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de: Microbiólogo industrial. Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libres de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, D.c. Enero 2007. [Fecha de Consulta: 29/12/2013]. Disponible en:  
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis285.pdf>
10. Cáceres García Juan Carlos & Reyna López Andrés. Modelamiento microbiológico para la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Universidad de la Sabana. Facultad de ingeniería de producción agroindustrial. Bogotá 2002. [Fecha de Consulta: 29/12/2013]. Disponible en:



<http://intellectum.unisabana.edu.co:8080/jspui/bitstream/10818/5072/1/130028.pdf>

11. Casco Montenegro Gerardo. Caracterización química de tres marcas comerciales de aguardiente en Honduras (Tatascan, Yuscara y Ron plata). [Tesis de Grado para Licenciatura en Ingeniería en Agrindustria]. Honduras. [Diciembre 2005]. [Fecha de Consulta 19/05/2013]. Disponible en: <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1067/1/T2032.pdf>
12. Castellucci Federico. Análisis Microbiológico de vinos y mostos. Revisión de la Resolución OENO 8/95. [Fecha de Consulta 18/12/2013]. Disponible en: <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=7&cad=rja&ved=0CFkQFjAG&url=http%3A%2F%2Fdocencia.izt.uam.mx%2Fsmk%2F233208%2Fpracticas%2Fexpoequipo4.ppt&ei=hCvMUqDzOcOnkQe9sICgDQ&usg=AFQjCNFuu8q7LNJo0nhWuolmtBF1dmvkFw>
13. Castillo Ávila, Berenice. Pruebas bioquímicas. 2012. [Fecha de Consulta 18/12/2013]. Disponible en: <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=12&cad=rja&ved=0CC0QFjABOAo&url=http%3A%2F%2Flabacteriologia.files.wordpress.com%2F2012%2F05%2Fpruebas-bioquimicas-4102c.pptx&ei=teO9Uq2gCqGr2QWmh4CYDw&usg=AFQjCNE6q3nM8DUjHbdBXbUwu4lg44jnrw&bvm=bv.58187178,d.b2l>
14. Comité Estatal de Sanidad Vegetal. Guanajuato. Campana de manejo fitosanitario de agave. 2007. [Fecha de Consulta 12/06/2013]. Disponible en: [http://www.cesaveg.org.mx/html/folletos/folletos\\_07/folleto\\_agave\\_07.pdf](http://www.cesaveg.org.mx/html/folletos/folletos_07/folleto_agave_07.pdf)
15. Consejo Regulador de Tequila. El Tequila. Elaboración. Jalisco. México. 2011. [Fecha de Consulta 07/01/2014]. Disponible en: [http://www.crt.org.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=92&Itemid=174](http://www.crt.org.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=92&Itemid=174)



16. Cueva E., Van Den V., Cabrera O., 1999. "Plantas silvestres comestibles del sur del Ecuador". Ediciones Abya-Yala. Quito. Ecuador. Pág. 80.
17. Fajardo Castillo Rika Esperanza & Sarmiento Forero Sandra Constanza. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtener el título de Microbiólogo Industrial. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, D.C. Agosto de 2007. [Fecha de Consulta: 29/12/2013]. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis26.pdf>
18. Ferreyra María Mercedes. Estudio del proceso biotecnológico para la elaboración de una bebida alcohólica a partir de jugo de naranjas. Universidad politécnica de Valencia. Departamento de tecnología de alimentos. Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI). UNLP. Concordia/ Valencia. Marzo de 2006. [Fecha de Consulta 18/12/2013]. Disponible en: <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/1933/tesisUPV2468.pdf>
19. Freire Fierro, A. 2004. Botánica Sistemática Ecuatoriana. Missouri Botanical Garden, FUNDACYT, QCNE, RLB y FUNBOTANICA. Murray Print, St. Louis. Pág. 79-91.
20. Fundación Ñamarín: Centro de Información Recolecciones. Datos. Usos del Chaguarmishqui. Quito. Centro de Turismo. 2009.
21. García, E. Javier; Méndez, S. de Jesús; Talavera, Daniel. El género agave spp. En México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. 2001. RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición. Edición Especial No. 5-2010. (ISSN 1870-0160). México. [Fecha de Consulta 18/12/2013]. Disponible en: [www.respyn.uanl.mx/especiales/2010/ee-05-2010/documentos/09.pdf](http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2010/ee-05-2010/documentos/09.pdf)





22. Ibarra, Silvia. Maguey o Agave. 2001. [En línea]. [Fecha de Consulta 18/12/2013]. Disponible en: <http://www.elportaldemexico.com/cultura/bebidas/magueyagave.htm>
23. Instituto Ecuatoriano de Normalización. NTE INEN 1 529-2:99. Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el Análisis microbiológico
24. del Ecuador. [Fecha de Consulta 17/05/2013]. Disponible en: <http://normaspdf.inen.gob.ec/pdf/nte/1529-2.pdf>
25. Jurado López Sofía Evelyn, Sarzosa Pazmiño Xavier Santiago. Estudio de la cadena agroindustrial de la cabuya en la producción de miel y licor de cabuya. Escuela Politécnica Nacional. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. Quito, Junio 2009. [Fecha de Consulta 18/12/2013]. Disponible en: <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1693/1/CD-2305.pdf>
26. Laboratorios Britania S.A. Caba – Argentina. Ref B0215206. 2002. [Fecha de Consulta 18/12/2013]. Disponible en: [http://www.britanialab.com/productos/363\\_hoja\\_tecnica\\_es.pdf](http://www.britanialab.com/productos/363_hoja_tecnica_es.pdf)
27. Laboratorios Conda S.A. Abril. 2010. [Fecha de Consulta 18/12/2013]. Disponible en: [http://www.condalab.com/uploads/media/1011\\_\\_AGAR\\_BISMUTO\\_SULFIT\\_O\\_02.pdf](http://www.condalab.com/uploads/media/1011__AGAR_BISMUTO_SULFIT_O_02.pdf)
28. Latorre García Lorena. Análisis estructural y modificación funcional de la glucoamilasa de *Saccharomyces cerevisiae* var. Diastaticus. Universitat de València. Departament de Bioquímica i. Biologia molecular. 2008. [Fecha de Consulta 18/12/2013]. Disponible en: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/9556/LATORRE.pdf;jsessionid=9ACECFD89721CFA10325689474D85B0B.tdx2?sequence=1>



- 29.** Macías Alejandro. El cluster en la industria del tequila en Jalisco, México. Centro Universitario del Sur. Universidad de Guadalajara. México. Revista Agroalim v.13 n.13 Mérida dic. 2001. [Fecha de Consulta 12/06/2013]. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S1316-03542001000200005&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S1316-03542001000200005&script=sci_arttext)
- 30.** Martínez María del Carmen; Pérez Alvarado Leticia. Análisis del mercado potencial del tequila 100% agave. México. 2008. [Fecha de Consulta 12/06/2013]. Disponible en: <http://itzamna.bnct.ipn.mx/dspace/bitstream/123456789/8879/1/MARINEZ%20MORALESpdf>
- 31.** Mario Cervantes Contreras & Aura Marina Pedroza Rodríguez. El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. Departamento de Matemáticas. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología-Instituto Politécnico Nacional. Ticoman. México D.F. 07340. Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Laboratorio de Biotecnología aplicada. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. 12 de mayo del 2007. [Fecha de Consulta 12/06/2013]. Disponible en: [http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA\\_9/nova8\\_artorig3.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA_9/nova8_artorig3.pdf)
- 32.** Méndez. Microbiología básica. Generalidades de los microorganismos (morfología, taxonomía, nutrición, reproducción y crecimiento). Julio. 2011. [Fecha de Consulta 18/12/2013]. Disponible en: [http://microbiologiadelosalimentosgastronomi.blogspot.com/2011\\_07\\_01\\_archive.html](http://microbiologiadelosalimentosgastronomi.blogspot.com/2011_07_01_archive.html)
- 33.** Montoya Rodríguez Isabel; Quintero Suárez Julia. Esquema tecnológico integral de la producción de bioetanol carburante. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Ingeniería Química. [Enero 2005]. [Fecha de Consulta 17/05/2013]. Disponible en: <http://www.cosaslibres.com/leer->



online/?title=Esquema+Tecnol%C3%B3gico+Integral+de+la+Producci%C3%B3n+de+Bioetanol+...&doc=http%3A%2F%2Fwww.bdigital.unal.edu.co%2F1043%2F1%2Fmariaisabelmontoyarodriguez.2005.pdf.pdf

34. Nieto Galarza Hernán Oswaldo. Proyecto previa a la obtención de Grado Académico o Título de: Ingeniero en Biotecnología. Evaluación de las condiciones de la fermentación alcohólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* y jugo de caña de azúcar como sustrato para obtener etanol. Escuela Politécnica del Ejército. Ingeniería en Biotecnología Sangolqui. Diciembre de 2009. [Fecha de Consulta: 29/12/2013]. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/990/1/T-ESPE-026782.pdf>
35. NMX-F-103-1982. Alimentos. Frutas y derivados. Determinación de grados Brix. Foods. Fruits and derivatives. Determination of degrees brix. Normas mexicanas. Dirección general de normas. [Fecha de Consulta 07/01/2014]. Disponible en: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-103-1982.PDF>
36. NOM-006-SCFI-1994. Norma Oficial Mexicana. Bebidas alcohólicas. Tequila-Especificaciones. [Fecha de Consulta 12/06/2013]. Disponible en: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/noficiales/NOM-006-SCFI-1994.PDF>
37. Pardo, Oriana. El agave americano (*Agave americana* L.): uso alimentario en el Perú. *Chloris Chilensis*. Año 8 N° 2. 2005. [Fecha de Consulta 18/12/2013]. Disponible en: <http://www.chlorischile.cl/agavepardo/Agavetexto.htm>
38. Pérez Linan. A y Col. Determinación química y estudio terapéutico de agave tequilana Weber. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. Laboratorio de Química y Manejo integral de Recursos Naturales. RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición. Edición Especial No. 5-2010 (ISSN 1870-0160). [Fecha de Consulta 12/06/2013]. Disponible en: <http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=agave%20azul%20composicion%20quimica%20pdf&source=web&cd=2&ved=0CDEQFjAB&url=http%3A%2>



F%2Fwww.respyn.uanl.mx%2Fespeciales%2F2010%2Fee-05-2010%2Fdocumentos%2F22.pdf&ei=a9\_2UZ30A4zk8gTYoIGgBw&usg=AFQjCNF7ijMuHGGy4ADKDwe09i0xgXtgQw&bvm=bv.49784469,d.eWU&cad=rja

39. Ramírez Delia. 2010. [Fecha de Consulta 18/12/2013]. Disponible en: <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/1991/1/03%20IEA%20306%20DOCUMENTO%20TESIS.pdf>.
40. Romo, Alfonso. Química, universo, tierra y vida. VI. Fermentaciones, pulque, colonche, tesgüino, pozol, modificaciones químicas. 1996. [Fecha de Consulta 18/12/2013]. Disponible en: [http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/51/htm/sec\\_9.html](http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/51/htm/sec_9.html)
41. Sampedro Alban, Milton Paul. Estudio e investigación del Shawarmishki (agua miel), análisis de sus propiedades, su explotación, aplicación culinaria de este producto milenario. Universidad Tecnológica Equinoccial. Facultad de turismo, preservación ambiental, hotelería y gastronomía. Quito. [2009]. [Fecha de Consulta 18/12/2013]. Disponible en: [http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/9605/1/37366\\_1.pdf](http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/9605/1/37366_1.pdf)
42. Valenzuela Zapata Ana Guadalupe. Las denominaciones de origen tequila y mezcal y la biodiversidad en el género agave sp. 2007. [Fecha de Consulta 12/06/2013]. Disponible en: [http://www.esac.pt/cernas/comunicacoes\\_biodo/3.%20ana%20valenzuela\\_pdf.pdf](http://www.esac.pt/cernas/comunicacoes_biodo/3.%20ana%20valenzuela_pdf.pdf)
43. Petrenko, Olena. Estudio de algunas características de las cepas de levaduras y de su rendimiento celular utilizando un medio de cultivo a base de suero lácteo. Universidad de Belgrano. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Buenos Aires, 2005. [Fecha de Consulta 05/03/2014]. Disponible en: [http://www.ub.edu.ar/investigaciones/tesinas/147\\_petrenko.pdf](http://www.ub.edu.ar/investigaciones/tesinas/147_petrenko.pdf)



44. Oliveira, Valdineia y Col. Biochemical and Molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from sugar-cane juice fermentations and their impact in Cachaca production. Universidade Federal de Ouro Preto. Departamento de Química. Centro de Biología. Vol. 74. No 3. Brasil, 2008. [Fecha de Consulta 24/09/2013].
45. Vaughan Martini, Ann. Martini, Alessandro. A taxonomic key for the genus *Saccharomyces*. Universita di Perugia. Dipartimento di Biologia Vegetale. New York. 1992. [Fecha de Consulta 24/09/2013].
46. Asyikeen, Noroul y Col. A new source of *Saccharomyces cerevisiae* as a leavening agent in bread making. University Kebangsaan Malaysia. Faculty of Science and Technology. Malaysia. 2013.
47. Linares María, Solís Francisco. Identificación de levaduras. Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 978-84-611-877. 2007. [Fecha de Consulta 20/03/2014]. Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo11.pdf>
48. Josafad Santiago, Mendoza Mariano, Borrego Fernando. Evaluación de tomate (*Lycopersicon esculentum*, MILL) en invernadero: criterios fenológicos y fisiológicos. Agronomía Mesoamericana 9(1): 59-65. México. 1998. [Fecha de Consulta 20/03/2014]. Disponible en: [http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v09n01\\_059.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v09n01_059.pdf)
49. Garzón Sandra; Hernández Catalina. Estudio comparativo para la producción de etanol entre *Saccharomyces cerevisiae* silvestre, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 Y *Candida utilis* ATCC 9950. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnologías. 2009. [Fecha de Consulta 20/03/2014]. Disponible en: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/1689/1/66182G245.pdf>
50. Téllez Mora, Peraza Luna, Fera Velasco, Andrade González. Optimización del proceso de fermentación para la producción de tequila, utilizando la

metodología de superficie de respuesta (MSR). Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Jalisco y de Tizimín,. Universidad de Guadalajara. Rev. Mex. Ing. Quím vol.11 no.1 México abr. 2012. [Fecha de Consulta 20/03/2014]. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1665-27382012000100014&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1665-27382012000100014&script=sci_arttext)

- 51.** Vázquez Mayra; Vázquez Ligia. Obtención de vodka a partir de dos tipos de maíz (Zea mays): maíz amarillo amiláceo y maíz blanco de Grano vitrio. Universidad Técnica del Norte. Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y ambientales. Ibarra. Ecuador. 2009. [Fecha de Consulta 7/04/2014]. Disponible en: <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/528/1/03%20AGI%20239%20TESIS.pdf>
- 52.** Villanueva Elizabeth. Determinación de parámetros en la elaboración de un destilado de uvas pasas (Vitis vinífera L.), Variedad Italia blanca a través de sus características físico químicas y sensoriales. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann – Tacna. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Perú. 2013. [Fecha de Consulta 7/04/2014]. Disponible en: [http://tesis.unjbg.edu.pe:8080/bitstream/handle/unjbg/270/155\\_2013\\_Villanueva\\_Quejia\\_EM\\_FCAG\\_Aliementarias\\_2013.pdf?sequence=1](http://tesis.unjbg.edu.pe:8080/bitstream/handle/unjbg/270/155_2013_Villanueva_Quejia_EM_FCAG_Aliementarias_2013.pdf?sequence=1)

## 7. ANEXOS

### 1. NORMA NMX-V-022-1972



#### EL PROGRAMA UNIVERSITARIO DE ALIMENTOS

NMX-V-022-1972. AGUAMIEL. HYDROMEL. NORMAS MEXICANAS.  
DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.

#### 1. GENERALIDADES Y DEFINICIONES

##### Generalidades

El aguamiel es un líquido traslúcido, de color ambarino, de olor y sabor característicos que se aprecian mediante prueba de catado.

##### Usos

El aguamiel se utiliza principalmente como sustrato fermentable en la elaboración del pulque.

##### Alcance

Esta Norma se aplica a las características, recepción, clasificación, valuación y aprovechamiento del aguamiel que, en forma directa o indirecta, sirva como sustrato fermentable.

##### Datos para el pedido

Para la fácil identificación del aguamiel normalizada, el pedido debe especificar los siguientes datos: nombre del producto, tipo, cantidad expresada en unidades de producto, volumen expresado en litros, en caso de no hacer uso del Sello Oficial de Garantía, señalamiento del lugar donde se verifique la calidad, incluyéndose, si es necesario, otros datos que faciliten el intercambio comercial y Norma de referencia.

##### Definiciones

##### Aguamiel

Para los efectos de esta Norma, se entiende por aguamiel, el jugo que se obtiene mediante el raspado previo del cajete o cavidad central del maguey pulquero.

##### Maguey pulquero



Es la planta de la que se obtiene el aguamiel para la producción del pulque, que se cultiva principalmente en los estados de México, Hidalgo y Tlaxcala y que corresponde a ciertas especies del género Agave.

Maguey al "hilo"

Es la planta que habiendo alcanzado su óptimo desarrollo vegetativo, momento en que se abren las puntas de las hojas centrales, se encuentra en condiciones de ser sometida a la práctica de "capazón o capado".

"Capado o capazón del Maguey"

Es el corte que se practica en la base del vástago incipiente, de la floración, para evitar que esta se efectúe.

Añejado del Maguey

Es el tiempo en que la planta, después de ser "capada", alcanza las condiciones que son favorables para la obtención del aguamiel, mediante el raspado.

Picado del Maguey

Es la formación manual de la cavidad o cajete del maguey, hasta un diámetro que esté de acuerdo con el tamaño de la planta; dando a los restos del material picado tiempo suficiente para lograr repetidamente las condiciones favorables a la explotación de la planta.

Raspado del Maguey

Es el corte cuidadoso y fino que se practica diariamente en los tejidos del bordeu orilla del cajete del maguey, para evitar la cicatrización y estimular la producción del aguamiel, ahondando la cavidad de dicho cajete para permitir su almacenamiento.

## CLASIFICACIÓN Y ESPECIFICACIONES

### CLASIFICACIÓN

El aguamiel se clasifica en 2 tipos, con un solo grado de calidad.

TIPO I.- Es el producto que cumple con las definiciones señaladas en los incisos 1.2.1. al 1.2.7. y que debe satisfacer las especificaciones anotadas en la Tabla I. (Ver inciso 4.1.1.).

TIPO II.- Es el producto que cumple con las definiciones señaladas en los incisos 1.2.1. al 1.2.7. y que debe satisfacer las especificaciones anotadas en la Tabla I (Ver inciso 4.1.2)..



## Especificaciones Físicas y Químicas. Bioquímicas

## 2.2.2.1 Organolépticas

TABLA 1.

ESPECIFICACIONES	TIPO I		TIPO II
			MENOR
pH	6.6	7.5	4.5
Densidad grados Baumé (Bé)	5	7	4.5
Índice de refracción con el refractómetro de inmersión	59	100	27
Sólidos totales g/100 ml.	13	17	7
Azúcares reductores totales (en glucosa) g/100 ml.	8	12	6
Azúcares reductores directos (en glucosa) g/100 ml.	2	3	3
Gomas (en glucosa) g/100 ml.	2	6	0.20
Proteínas mg/100 ml.	300	600	100
Cenizas mg/100 ml.	300	430	180
	<b>NO MAYOR DE:</b>		
Acidez mg/100 ml (como ácido láctico).	0.90	1.03	4.00

Color: Debe tener un color ambarino, propio del producto.

Olor: Debe ser el característico del producto.

Sabor: El sabor del aguamiel debe ser dulce, suigéneris.

Aspecto: Debe tener aspecto traslúcido.

## Muestreo

Para definir la aceptación o rechazo del producto, el muestreo se realiza determinando, como mínimo, las siguientes especificaciones fijas que son: el pH y el contenido de reductores totales. Para tal fin, se debe tomar una muestra no menor de 100 ml por unidad o envase.

El resto de las especificaciones de la Tabla I, se determina en la muestra de común acuerdo comprador y vendedor; a falta de este acuerdo se procede como se indica en la Tabla II.

TABLA II

NO. DE ENVASES DE AGUAMIEL	NO. DE ENVASES A MUESTREAR
1 – 5 unidades	1 envase
6 – 20 unidades	5 envases



De cada envase a muestrear, se toma una muestra constituida con porciones aproximadamente iguales, extraídas de los niveles inferior, medio y superior(ver inciso 4.1.3.). El volumen extraído no debe ser menor de dos litros, que constituye la muestra final, la cual debidamente homogeneizada, se utiliza para determinar las especificaciones de la Tabla I.

2.2.3.2 Debido a la inestabilidad del producto, la verificación de las especificaciones debe hacerse de inmediato a la entrega del producto en el lugar de recepción.

#### Envasado

El producto debe envasarse en recipientes que garanticen su calidad sanitaria.

#### Marcado

Cada envase debe llevar impresas, en forma destacada y perfectamente legibles, las siguientes indicaciones:

Nombre el producto, contenido neto expresado en litros, lugar de envasamiento y nombre o razón social del productor.

En caso de que del producto se embarque a granel, los datos anteriores figurarán en los documentos de la transacción comercial.

### MÉTODOS DE PRUEBA

Para verificar las especificaciones que se establecen en esta Norma, deben aplicarse las siguientes Normas de Métodos de Prueba en vigor:

- NMX-V-017 Determinación del Extracto Seco y Cenizas en Bebidas Alcohólicas.
- NMX-V-024 Determinación de la Densidad (grados Baumé).
- NMX-V-029 Determinación de Proteínas.
- NMX-V-040 Determinación de Reductores Totales y directos (en glucosa). NMX-V-041 Determinación de pH.
- NMX-V-043 Determinación de la Acidez Total.
- NMX-V-045 Determinación el Índice de Refracción con el Refractómetro de inmersión.
- NMX-F-111 Determinación de Sólidos Totales.
- Determinación Gomas, aplíquese el Método de Prueba NMX-V-40 con la siguiente modificación:

Cuando se trate determinar Gomas como dextrinas, se sigue el mismo procedimiento que para Reductores Totales, hasta donde se enuncia calentar a baño de vapor a 60° durante 10 minutos en vez de esta temperatura será calentar a ebullición y reflujo durante una hora y se continúa el método.



La cantidad de gomas estará dada por el valor obtenido en la determinación de gomas menos el de Reductores Totales.

## APÉNDICE

### Observaciones

Para obtener aguamiel de Tipo I se recomienda, se inicie la recolección del producto 15 días después del primer raspado, en un lapso que varíe de 30 a 60 días.

El aguamiel en ambos tipos no debe presentar signos de fermentación avanzada.

Para efectuar el muestreo a tres niveles, debe emplearse un tipo de sonda para tres niveles con la cual se obtengan resultados satisfactorios.

## BIBLIOGRAFÍA

Datos proporcionados por el Patronato del Maguey y la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

Fecha de aprobación y publicación: Septiembre 26, 1972. Esta Norma Cancela a la: NMX-V-022-1970.

## 2. TABLAS DE CONVERSIÓN DE UNIDADES DE MEDIDA

### REFRACTOMETROS



#### Tablas de conversión de unidades de medida

Densidad	Grado Baumé	Grado Brix	Alcohol probable
1000	0		
1001	0.14		
1002	0.28		
1003	0.43		
1004	0.57		
1005	0.71		
1006	0.85		
1007	1.00		
1008	1.14		
1009	1.28		
1010	1.42		
1011	1.56		
1012	1.70	0.20	0.11
1013	1.84	0.47	0.23
1014	1.98	0.73	0.43
1015	2.12	1.10	0.59
1016	2.27	1.26	0.70
1017	2.41	1.53	0.88
1018	2.55	1.80	1.06
1019	2.68	2.06	1.18
1020	2.82	2.33	1.35
1021	2.91	2.59	1.47
1022	3.10	2.86	1.65
1023	3.24	3.13	1.82
1024	3.37	3.39	1.94
1025	3.51	3.66	2.21
1026	3.65	3.92	2.30
1027	3.79	4.19	2.41
1028	3.92	4.46	2.69
1029	4.06	4.72	2.77
1030	4.20	5.00	2.95
1031	4.33	5.27	3.06
1032	4.47	5.54	3.24
1033	4.60	5.80	3.42
1034	4.74	6.07	3.54
1035	4.88	63.3	3.71
1036	5.01	6.6	3.7
1037	5.15	6.9	4.0
1038	5.28	7.2	4.2
1039	5.41	7.4	4.4

Densidad	Grado Baumé	Grado Brix	Alcohol probable
1040	5.50	7.6	4.5
1041	5.68	8.0	4.7
1042	5.81	8.2	4.8
1043	5.95	8.4	5.0
1044	6.08	8.7	5.1
1045	6.21	9.0	5.3
1046	6.34	9.2	5.4
1047	6.48	9.5	5.6
1048	6.61	9.8	5.7
1049	6.74	10.0	5.9
1050	6.87	10.3	6.0
1051	7.00	10.6	6.2
1052	7.13	10.8	6.3
1053	7.26	11.1	6.5
1054	7.39	11.4	6.7
1055	7.52	11.6	6.8
1056	7.65	11.9	7.0
1057	7.78	12.2	7.2
1058	7.91	12.4	7.3
1059	8.03	12.7	7.5
1060	8.16	13.0	7.6
1061	8.29	13.2	7.8
1062	8.42	13.5	7.9
1063	8.55	13.8	8.1
1064	8.67	14.0	8.2
1065	8.80	14.3	8.4
1066	8.93	14.6	8.6
1067	9.06	14.8	8.7
1068	9.18	15.1	8.9
1069	9.31	15.4	9.0
1070	9.43	15.6	9.2
1071	9.56	15.9	9.3
1072	9.68	16.2	9.5
1073	9.81	16.4	9.6
1074	9.93	16.7	9.8
1075	10.06	17.0	10.0
1076	10.18	17.2	10.1
1077	10.31	17.5	10.3



### 3. NTE INEN 1 529-2:99

#### **Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el Análisis microbiológico**

##### **1. OBJETO**

**1.1** Esta norma, según la naturaleza del producto, establece los procedimientos generales para la toma de muestras de alimentos, el envío al laboratorio y su preparación en el laboratorio.

##### **2. ALCANCE**

**2.1** Los procedimientos establecidos en esta norma para la preparación de la muestra se refieren al tratamiento inicial al que se deben someter las muestras de alimento destinadas al análisis microbiológico, según se indica en la serie de NTE "INEN 1529 Control Microbiológico de los Alimentos", excepto en las NTE INEN 1529-1 y 1529-12.

**2.2** Esta norma no se aplica para casos de brotes epidémicos o intoxicaciones, ni para decidir el tamaño de la muestra.

##### **3. DEFINICIONES**

**3.1** Para los efectos de esta norma se adoptan las definiciones contempladas en cada una de las Normas Técnicas Ecuatorianas (NTE) INEN de Requisitos sobre alimentos y las que a continuación se detallan:

**3.1.1 Lote.** Es la cantidad de alimento producida y manipulada bajo condiciones que se suponen uniformes. En la práctica, esto generalmente significa un alimento producido en un batch, o cuando el proceso es continuo dentro de un período de tiempo definido y en un lugar determinado, por ejemplo, en una línea de producción determinada, en un autoclave u otra unidad crítica de tratamiento. Los diferentes lotes son identificados mediante códigos.

**3.1.2 Partida.** Es la cantidad de alimento, grande o pequeña, enviada a un determinado destinatario. Normalmente consiste en numerosas cajas de alimento procedente de uno o más lotes.

**3.1.3 Toma de muestras.** Es el acto de seleccionar y coger una determinada cantidad, o un número de recipientes o unidades de producción de un mismo lote de alimento, o de áreas de superficie que son o que entran en contacto con productos alimenticios.

**3.1.4 Unidad de muestreo.** Es la parte definible más pequeña de un lote (unidad de producción). Esto puede significar una lata, o un paquete. Cuando la producción es a granel y se envasa en cajas, bidones, barriles, sacos, etc., entonces la unidad de muestreo es arbitraria y puede depender del utensilio para tomar muestras. No se debe confundir esta unidad de muestreo con la unidad de muestra realmente utilizada en el análisis.

**3.1.5 Unidad de muestra.** Es la cantidad de material (tomada de la muestra de población) que realmente se utiliza en el análisis, es la unidad analítica. En general, para los ensayos microbiológicos se utiliza una unidad de muestra de 10 ó 25 g ó cm<sup>3</sup> o sus múltiplos.

**3.1.6 Muestra.** Parte del conjunto (población) a partir de la cual se trata de estimar, mediante análisis o examen, las propiedades del conjunto. Se debe tener en cuenta que



sólo puede someterse a análisis una parte (unidad de muestra) de la muestra de población (ver 3.1.5 y 3.1.7).

**3.1.7 Muestra de población.** Número total (una o más) de unidades de muestreo individuales tomadas de la población (idealmente, obtenidas de una forma aleatoria) que se destinan al análisis de acuerdo con un programa de muestreo determinado (ver nota 1)

**3.1.8 Muestra selectiva (sesgada).** Es la muestra de alimento, tomada para demostrar o documentar las condiciones insatisfactorias observadas por el inspector, o bien, para contar con una unidad del alimento que se sospecha insatisfactorio y someterlo al análisis microbiológico.

**3.1.9 Muestra aleatoria.** Conjunto de unidades de muestreo elegidas de la población de modo que cada unidad tenga la misma probabilidad de ser seleccionada, con lo que se excluye la subjetividad del que toma las muestras. Normalmente implica la utilización de la tabla de los números aleatorios.

**3.1.10 Muestra representativa.** Es aquella cuyas características son tan similares como posible a las de la población de la cual proceden.

**3.1.11 Programa de muestreo.** Es la relación de los criterios de aceptación que se aplicarán a un lote basados en el análisis, por métodos específicos, del número necesario de unidades de muestra.

**3.1.12 Programa de atributos.** Es el programa de muestreo en que cada unidad de muestra seleccionada se clasifica de acuerdo a las características de calidad del producto y en el que solo hay dos o tres grados de calidad. Por ejemplo: aceptable, rechazable; presente, ausente; aceptable, provisionalmente aceptable, rechazable; recuento bajo, recuento medio, recuento alto (ver nota 2).

**3.1.13 Categoría.** Serie de factores relacionados con la naturaleza y tratamiento de un alimento, enmarcados en 15 series (1 a 15 categorías), que determina por anticipado el peligro de la presencia de determinadas especies o grupos bacterianos en un alimento.

**3.1.14 "n".** Número de unidades de muestra de un lote que se deben analizar, para satisfacer las exigencias de un determinado programa de muestreo.

**3.1.15 "c".** Número máximo aceptable de unidades de muestra que pueden presentar una tasa microbiana comprendida entre "m" y "M". Cuando se encuentra un número superior a "c", se rechaza el lote.

**3.1.16 "m".** Valor (criterio) microbiológico aceptable de bacterias por gramo o cm<sup>3</sup>. Los valores superiores a "m" se aceptan provisionalmente o se rechazan.

**3.1.17 "M".** Valor (criterio) microbiológico utilizado solo en programas de tres clases, para separar la calidad rechazable de la provisionalmente aceptable. En cualquier unidad de muestra, los valores iguales a, o superiores a "M" no son aceptables.

**3.1.18 Aceptación-rechazo.** La decisión de aceptar o rechazar un lote, en base a un programa de muestro asociado a un análisis microbiológico determinado, se aplica solo al propósito para el que se realizó dicho análisis (o varios de ellos).

NOTA 1 La muestra de población y la unidad de muestra pueden ser lo mismo pero, de preferencia, la muestra de población debe ser considerablemente más grande que la unidad de muestra que habrá de analizarse y cada muestra de población proporciona sólo

un resultado por cada análisis realizado. Por tanto, si se analiza más de una unidad de muestra de la misma muestra de población, los resultados se promedian.

NOTA 2 En las Normas Técnicas Ecuatorianas (NTE) de requisitos se utilizan programas de muestreo por atributos, de dos y tres clases. Un programa de muestreo de dos clases requiere de las siguientes especificaciones: "n", "c" y "m" y los de tres clases: "n", "c", "m" y "M".

**3.1.19 Suspensión inicial (dilución primaria).** Es la suspensión, solución o emulsión obtenida después que la cantidad del producto en análisis (o de la porción de muestra preparada para el ensayo) ha sido pesada o medida y luego mezclada, utilizando un homogeneizador cuando es necesario y observando las precauciones apropiadas, con un volumen de diluyente igual a nueve veces la unidad de muestra, para que los microorganismos presentes en la unidad de muestra se distribuyan lo más uniformemente posible y se permita que las partículas grandes, si las hay, se sedimenten (ver nota 3).

**3.1.20 Otras diluciones decimales.** Las suspensiones, soluciones o emulsiones obtenidas mezclando un volumen específico de la dilución primaria con nueve veces el volumen del diluyente y repitiendo esta operación con cada dilución así preparada, hasta obtener una serie de diluciones decimales adecuada para la inoculación del medio de cultivo.

## 4. EQUIPO, MATERIAL Y DILUYENTES

### 4.1 Generalidades

**4.1.1** El equipo y material utilizados en la toma de muestras deben ser de acero inoxidable u otro material de resistencia adecuada, que no produzca cambios en la muestra que puedan afectar los resultados de los exámenes subsiguientes. El equipo debe ser lo suficientemente robusto para evitar deformaciones en el uso y lo suficientemente leve que permita al operador moverlo en el producto, fácil y rápidamente. Si los utensilios o aparatos son soldados, la suelda debe resistir temperaturas de 180°C. Todas las superficies deben ser lisas y libres de hendiduras, todas las esquinas deben ser redondeadas. El equipo para tomar muestras debe cumplir con los requisitos específicos adecuados a cada producto.

**4.1.2** Los frascos para muestras y sus cierres, deben ser de un material resistente a esterilizaciones repetidas, inerte, impermeable al agua y a las grasas (acero inoxidable, vidrio y algunos plásticos). También se puede utilizar envases desechables de plástico, hojas de aluminio o fundas plásticas con cierres apropiados. De preferencia deben ser opacos y de capacidad y forma adecuadas para tomar la unidad de muestra deseada. Los frascos para productos sólidos, semisólidos o viscosos deben ser de boca ancha.

**4.1.3** Todo el material y utensilios utilizados en la toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico deben estar perfectamente limpios, secos, envueltos individualmente y esterilizados por uno de los siguientes métodos físicos:

**4.1.3.1** Vapor a presión de 15 libras/ pulgada<sup>2</sup> (autoclave): 121°C durante 20 min, mínimo.

**4.1.3.2** Aire caliente: 170-175°C, en el punto más frío, durante 1 h, mínimo. Utilizar un horno con una eficiente circulación de aire para que haya la seguridad de que en todas las partes del horno se mantiene la temperatura fijada. Si por alguna razón, es imposible la



esterilización por estos dos métodos, utilizar los siguientes métodos alternos, que son secundarios, y se los recomienda siempre que el material sea utilizado inmediatamente después de esterilizado y enfriado.

**4.1.3.3** Vapor fluente: 100°C por una hora.

**4.1.3.4** Agua hirviendo: ebullición en agua por 20 min, mínimo.

NOTA 3 En algunos casos puede necesitarse, especialmente para productos que dan una suspensión inicial 1+9 demasiado viscosa o demasiado espesa, añadir más diluyente. En algunos otros casos, cuando se necesita relacionar los resultados de los análisis con determinados criterios de especificación, puede ser necesario una dilución primaria más concentrada que 1+9. Estos factores deben ser tenidos en cuenta para las operaciones subsiguientes y/o en la expresión de resultados.

OBSERVACIÓN. Las definiciones contenidas en los numerales 3.1 al 3.18, inclusive, son según la FAO y la "International Commission on Microbiological Specifications for Foods" (ICMSF).

**4.1.3.5** Inmersión en etanol al 96% (v/v) y flameado hasta que el etanol se consuma. Para materiales que resisten la llama directa.

**4.1.3.6** Combustión: exponer a la llama de un mechero de Bunsen o de alcohol hasta la incandescencia y enfriar. Para objetos que resistan la incandescencia.

## **4.2 Equipo y material**

**4.2.1** *Para abrir envases:* tijeras, cuchillos, abridores de latas y de botellas, martillos, alicates, destornilladores, herramienta especial para abrir cajas de cartón, bisturíes, etc.

**4.2.2** *Para tomar muestras:* sierras; sondas especiales que penetren en el producto y corten un trozo cilíndrico; taladros; cucharas; cucharones de draga; pinzas; tenedores; torundas; plantillas de metal, con un cuadrado de superficie conocida recortado en el centro; fundas plásticas con cierre apropiado; papel aluminio; compuesto obturante, para cerrar los orificios dejados en los quesos al tomar las muestras.

**4.2.3** *Para tomar muestras congeladas:* taladro eléctrico de alta velocidad, hacha, cincel.

**4.2.4** *Para controlar la temperatura:* termómetro manual de cuadrante, para controlar la temperatura ambiente y del producto.

**4.2.5** *Para transportar muestras:* refrigeradora portátil capaz de enfriar hasta 0°C a 5°C en poco tiempo. Nevera isotérmica con cierre hermético y material aislante entre la pared interna y la externa, para transportar muestras congeladas o refrigeradas.

**4.2.6** *Para etiquetar:* etiquetas y marcadores.

**4.2.7** *Equipo para esterilización:* autoclave u horno portátiles o mechero de alcohol, y un agente desinfectante (alcohol al 70%).

**4.2.8** *Equipo para mantener muestras:* refrigeradora, para almacenar muestras a 2°C y congelador para almacenar a temperaturas menores de -20°C.

**4.2.9** *Equipo para descongelar muestras:* baño de agua controlado termostáticamente con agitador, que opere  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  y otro, a  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ .



**4.2.10 Frascos para muestras:** frascos de boca ancha con tapa de rosca, envases desechables de plástico. Para el transporte de muestras deben ser de un material que absorba los golpes.

**4.2.11 Equipo para homogeneizar muestras:** homogeneizadores, vortex, trituradores, "stomacher", molinos.

**4.2.12 Equipo para medir el pH:** pH metro, con compensación de temperatura y sensibilidad de 0,1 de unidad de pH.

**4.2.13 Equipo para pesar muestras:** Balanza con exactitud clase II y graduación mínima de 0,1 g.

**4.2.14 Materiales varios:** erlenmeyers, probetas, tubos, pipetas, jeringuillas.

### **4.3 Diluyentes**

**4.3.1** Agua peptona al 0,1% : para uso general.

**4.3.2** Agua peptona tamponada: para *Salmonella*.

**4.3.3** Agua peptona sal al 15%: para extremadamente halófilos.

**4.3.4** Agua peptona sal al 5%: para halófilos moderados y halotolerantes.

**4.3.5** Caldo TSB: para revitalización.

**4.3.6** Caldo reforzado para clostridios: para anaerobios.

**4.3.7** Solución de calgón [hexametáfosfato sódico,  $(\text{NaPO}_3)_6$ ] al 1% en solución Ringer diluida al ¼: diluyente para hisopos de alginato.

**4.3.8** Solución de citrato sódico al 2%, pH  $7,5 \pm 0,1$ : para quesos, leches fermentadas, leche en polvo "roller".

**4.3.9** Solución de fosfato dipotásico al 2%: para caseína ácida, caseína láctica y suero ácido en polvo el diluyente debe tener un pH de  $8,4 \pm 0,1$  y  $7,5 \pm 0,1$  para crema ácida, quesos, caseínatos.

**4.3.10** Solución de fosfato tripotásico ( $\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) al 8% para ajustar el pH de las muestras.

**4.3.11** Solución Ringer al 1/4: para mantequillas

**4.3.12** Solución de sacarosa al 20%: para osmófilos.

**4.3.13** Solución salina peptonada: para uso general.

## **5. TOMA DE MUESTRAS**

### **5.1 Disposiciones administrativas** (ver nota 4)

**5.1.1** La toma de muestras debe realizar un agente autorizado o un agente independiente autorizado que ha recibido formación técnica apropiada. El o la agente debe actuar independientemente y no aceptar la interferencia de terceros. Bajo su responsabilidad puede recibir ayuda de otros. Cuando sea posible, se debe permitir a los delegados de las partes interesadas presenciar la toma de muestras. El agente y su(s) ayudante debe tomar las medidas adecuadas para prevenir cualquier contaminación tanto del envío [o lote(s)] como de las unidades de muestreo (por ejemplo, lavarse y desinfectarse las manos antes de manipular el material a muestrearse, vestir un delantal u overol blanco y limpio, usar mascarilla y gorro, trabajar observando rigurosamente todas las medidas previstas en el programa de la planta para la higiene y desinfección de los empleados).

**5.1.2** Se sellará y etiquetará cada muestra. Fijar el sello de manera que sea imposible remover el contenido o la etiqueta sin destruir el sello. Las etiquetas deben ser de tamaño y calidad adecuadas para el propósito (por ejemplo una cartulina de color claro, un cartón a prueba de grasa y de agua y con un ojete reforzado). Escribir la información con tinta indeleble indicando, por lo menos, la naturaleza del producto, el número y código del lote, la fecha de la toma de muestras, el nombre y la firma del agente que tomó las muestras. Cuando sea necesario, se puede incluir información adicional tal como el propósito de la toma de muestras, la masa o volumen de la muestra, la marca de identificación de la unidad (caja, bidón, etc.) de donde se tomó la muestra.

**5.1.3** Se tomarán todas las muestras, cuando menos, por duplicado y se conservarán en condiciones idénticas a las que tenían en el momento de la toma. De ser necesario, y cuanto antes, se debe poner una serie a disposición de la otra parte. Previo convenio de las partes, se recomienda la toma de series adicionales de muestras, las cuales, en caso necesario, deben guardarse para un arbitraje independiente. Una vez tomadas las muestras, enviar las muestras al laboratorio para su análisis.

**5.1.4** Las muestras se deben acompañar de un informe de la toma de muestras firmado por el agente responsable de la toma y refrendado por posibles testigos. En el informe debe constar la siguiente información:

**5.1.4.1** Lugar, fecha y hora en que se realizó la toma de muestras.

**5.1.4.2** Nombre y dirección del agente que realizó la toma de muestras y de los posibles testigos.

**5.1.4.3** Método exacto de la toma de muestras (aleatorio en todo el lote, aleatorio en las partes accesibles o por otro método).

**5.1.4.4** Procedimiento exacto utilizado para tomar las muestras, si éste difiere de las instrucciones dadas en esta norma.

**5.1.4.5** Motivo de la toma de muestras.

**5.1.4.6** Naturaleza del alimento.

**5.1.4.7** Número y código del lote, códigos de los baches y el número y tamaño de las unidades que constituyen el lote.

**5.1.4.8** Tamaño y número de las muestras de población debidamente identificadas en relación al lote, bache y/o unidad (caja, bidón, etc.) del cual proceden.

**5.1.4.9** Lugar a donde se enviarán las muestras.

**5.1.4.10** Ensayos solicitados.

**5.1.4.11** Nombre y dirección del laboratorio que analizará las muestras.

**5.1.4.12** Temperatura del producto al momento de la toma de muestras.

**5.1.4.13** Origen del envío y lugar de destino.

**5.1.4.14** Si es posible, el nombre y la dirección del fabricante, importador, vendedor o comprador, según proceda.

**5.1.4.15** Cuando convenga, se debe mencionar en el informe, además, cualquier condición o circunstancia relevante de la toma de muestras (por ejemplo, el estado de los envases y sus alrededores, la temperatura y humedad atmosféricas, la edad del producto, método de esterilización del material para tomar muestras), si la muestra es una mezcla de submuestras y cualquier información especial referente al producto muestreado, por ejemplo, la dificultad para homogeneizar el producto.



## **5.2 Número de muestras de población que se deben tomar**

**5.2.1** Se debe tomar un número de muestras de población equivalente al número "n" de unidades de muestra indicado en el programa de muestreo especificado, ya sea, en las respectivas NTE de requisitos o en un contrato, o según lo acordado entre las partes interesadas o según un programa diseñado para enfrentar una situación emergente (brote de intoxicación, por ejemplo).

## **5.3 Técnicas para la toma de muestras**

### **5.3.1 Generalidades**

**5.3.1.1** Tomar las muestras en condiciones asépticas, con rapidez pero cuidadosamente, y de tal manera, para que la muestra sea representativa del producto que se quiere analizar.

**5.3.1.2** Antes de abrir un envase limpiar la zona apropiada con agua tibia y jabón y pasar alcohol al 70% sin flamear, o si es un envase de papel, retirar la parte externa. Abrir el envase asépticamente con instrumentos estériles. Para cada envase utilizar un instrumento estéril.

**5.3.1.3** Cuando sea posible, mezclar bien el producto hasta que esté homogeneizado y, cuando no lo es, asépticamente, tomar alícuotas de diferentes sitios del recipiente hasta completar una cantidad no inferior a 100 g ó cm<sup>3</sup>.

**5.3.1.4** Si se han de realizar diferentes tipos de análisis (microbiológicos, químicos, físicos y sensoriales), asépticamente tomar primero y por separado las unidades de muestra destinadas al análisis microbiológico. Para conservar estas muestras no se debe utilizar preservantes

**5.3.1.5** Registrar la temperatura del aire de la sala de almacenamiento o del vehículo, tomar la muestra, luego, insertar el termómetro en el alimento del que se tomó la muestra y registrar su temperatura. Cuando el alimento está envasado en pequeños envases cerrados, registrar la temperatura del alimento en un envase adyacente en la misma caja de cartón o embalaje.

**5.3.1.6** El tamaño de la muestra de población debe ser de 100 cm<sup>3</sup> o gramos, mínimo. En muchos casos será el de la unidad de producción del lote como latas herméticamente cerradas conteniendo muchas veces la cantidad de alimento equivalente a la unidad de muestra, o envases muy pequeños de los que se necesitará tomar varios de ellos hasta completar los 100 g.

### **5.3.2 Procedimientos para tomar muestras**

**5.3.2.1 Productos en envases pequeños.** Los alimentos, sean éstos líquidos, pastosos, sólidos o pulverulentos envasados en pequeños recipientes deben tomarse en su propio envase original, sin abrir.

a) Las mantecas, margarinas, mantequillas que se encuentren en unidades de 250 o más g, dividir las en cuatro partes y tomar como muestras las dos cuartas partes opuestas. Si la unidad pesa menos de 250 g, tomar toda la unidad.

b) De los quesos pequeños y de las porciones de queso envueltas y empacadas en envases pequeños tomar como muestra un queso completo y de las porciones, un número suficiente de ellas para que la muestra no sea inferior de 100 g.



### 5.3.2.2 Productos a granel (bidones, tambores, etc.).

#### a) *Productos líquidos.*

a.1) Evitando contaminar el contenido, mezclar los productos líquidos cuidadosamente con un cucharón estéril o mecánicamente, hasta que el producto esté totalmente mezclado; inmediatamente después de la mezcla, con un cucharón estéril y asépticamente transferir a un envase estéril una cantidad no inferior a 100 cm<sup>3</sup>. Si es difícil obtener una buena homogeneización, de sitios apropiados del recipiente tomar varias submuestras de manera a obtener una muestra no inferior a 100 cm<sup>3</sup> y que sea representativa del envase.

Inmediatamente cerrar y etiquetar el frasco. Para tomar una muestra de un ducto de salida, primero dejar pasar las primeras fracciones del producto para limpiar la salida con el flujo y luego tomar la muestra, no menos de 100 cm<sup>3</sup>.

a.2) En el caso de cremas, dar un número suficiente de golpes con el cucharón para asegurar una buena mezcla, sumergir el cucharón moviendo de un lado para otro con mucho cuidado para evitar la formación de espuma y de mantequilla. Tomar no menos de 100 cm<sup>3</sup> de muestra.

a.3) En el caso de leche condensada y evaporada mezclar muy cuidadosamente utilizando un agitador adecuado para raspar el material adherido a las paredes y al fondo del recipiente. Del contenido mezclado, trasladar de 2 a 3 litros a un recipiente más pequeño y agitarlo. Tomar no menos de 100 cm<sup>3</sup> de muestra.

#### b) *Productos sólidos.*

b.1) En el caso de productos sólidos, cuando la capa superficial no hace parte de la muestra, retirarla del área de muestreo con una espátula, cuchillo o cuchara estériles, hasta no menos 5 mm de profundidad y tomar la muestra con otro instrumento estéril. Si el producto es un polvo, la capa superficial se retira antes de mezclar. Si el alimento está formado por capas o extractos, separadamente y evitando contaminar las partes tomar muestras de cada una en la misma proporción en que se encuentran en el producto original.

b.2) En el caso de mantecas, margarinas, mantequillas a granel y el producto está en bloque, y para que la muestra no sea inferior a 100 g, realizar dos sondeos o más introduciendo una sonda verticalmente en el centro del bloque. Si el producto se encuentra en barriles, insertar la sonda diagonalmente a través de la masa del producto desde el borde del barril sin que penetre en la superficie del fondo. En los dos casos, hacer girar la sonda una vuelta completa y retirar el material por completo. Sostener la punta de la sonda encima de la abertura del frasco estéril, y con un cuchillo o espátula transferir inmediatamente la muestra de la sonda en pedazos de aproximadamente 75 mm. Dejar una porción de aproximadamente 25 mm o más de largo para obturar el agujero dejado por la sonda. No permitir que estos productos entren en contacto con papel o superficies absorbentes (porcelana) del agua o grasa. Los productos congelados hasta el punto de resistir la presión de la sonda deben ser ablandados manteniéndolos por 24 h a 10°C.

**5.3.2.3 Productos a granel congelados.** Para muestrear estos productos utilizar brocas, saca bocados y otros instrumentos cortantes estériles. Los productos congelados deben mantenerse en su estado congelado hasta su llegada al laboratorio (ver 6.7). Se debe evitar descongelar y congelar nuevamente la muestra.

a) La toma de muestras de piezas o bloques de alimentos de gran tamaño se puede realizar de la siguiente manera: sobre el alimento asegurar, con la copa hacia arriba, un embudo plástico estéril con el vástago recortado por donde se introduce la broca estéril de un taladro. Las virutas del alimento son conducidas a la superficie y se acumulan en la copa del embudo. Transferir estas virutas a un frasco estéril para muestras. Inmediatamente identificar la muestra y acondicionarla para su envío al laboratorio.

**5.3.2.4 Toma de muestras de superficies vivas.** Utilizando un hisopo humedecido, frotar la superficie de la palma de una mano, la superficie interna de los dedos y de las uñas (ver 5.3.2.7 literal b.1). También se puede realizar mediante la técnica del lavado: colocar la mano dentro de una funda plástica, verter 50 cm<sup>3</sup> de diluyente y frotar con el líquido las palmas, entre los dedos y uñas.

**5.3.2.5 Toma de muestras de superficies inertes.**

a) Botellas, envases, recipientes, utensilios pueden muestrearse mediante lavado, y si es posible, con hisopo (ver 5.3.2.7 literal b.1). Prestar especial atención a la porción de los utensilios que se introduce en la boca, por ejemplo, borde superior interno y externo de copas y vasos, porción cóncava de cucharas, etc. De los platos, la parte que entra en contacto con los alimentos.

b) La toma de muestras de superficies lisas puede realizarse con hisopo (ver 5.3.2.7 literal b.1) o con cilindros de agar. El cilindro de agar es un medio de agar estéril solidificado dentro de un tubo plástico estéril. Asépticamente, cortar uno de los extremos del cilindro, presionar la superficie de agar descubierta contra la superficie en estudio, con un escalpelo estéril cortar una rodaja y colocarla en una placa Petri, con la superficie sembrada hacia arriba. Identificar la muestra.

c) Las superficies lisas también se pueden muestrear utilizando un portaobjeto (ver 5.3.2.7 literal b.3).

**5.3.2.6 Toma de muestras destinadas al análisis de bacterias anaerobias.** Evitar que las muestras que contienen bacterias anaerobias entren en contacto con el aire, por ejemplo, de los tejidos profundos no tomar muestras pequeñas. Si esto no es posible y si se utilizan hisopos, humedecer el hisopo en el medio de transporte de Stuart (medio reducido), ver NTE INEN 1529-1 y una vez tomada la muestra, colocar el hisopo en un tubo que contenga este medio.

**5.3.2.7 Otros**

a) *Quesos grandes.* En el caso de quesos grandes tomar de las diferentes partes suficientes submuestras, hasta completar una muestra de por lo menos 100 g. De los maduros, retirar la envoltura externa y dejar intacta la interna (costra, cera, películas

plásticas o de tela en los quesos sin corteza). Dependiendo de la forma, la masa, el tipo y el grado de madurez del queso, utilizar una de las siguientes técnicas:

a.1) *Toma de muestras por medio de cortes.* Si el queso tiene una base circular, con un cuchillo con hoja puntiaguda, hacer dos cortes radiales a partir del centro del queso, y si tiene un base rectangular, hacer dos cortes paralelos con los lados. El tamaño de la pieza obtenida debe ser de tal manera, que una vez eliminada la capa superior incomedible, la porción comestible restante no sea inferior a 100 g.

a.2) *Toma de muestras por medio de una sonda.*

a.2.1) En una de las superficies planas, por lo menos a 10 cm del borde, insertar oblicuamente hacia el centro una sonda estéril de 15 a 20 mm de diámetro, una o varias veces.

a.2.2) Insertar la sonda perpendicularmente por una de las superficies del queso hasta llegar, pasando por el centro, al lado opuesto.

a.2.3) Por la superficie vertical del queso, a igual distancia entre las dos superficies planas, insertar la sonda horizontalmente hasta el centro del queso.

a.2.4) De los quesos contenidos en barriles, cajas u otros recipientes de dimensiones grandes, o de los quesos que forman cubos grandes compactos, la muestra puede tomarse insertando la sonda oblicuamente, desde arriba hacia abajo, por el contenido del recipiente.

a.2.5) En el caso de quesos duros de grandes dimensiones, si el queso tiene envoltura interna, frotar con etanol al 70% (V/V) el sitio de muestreo e insertar una sonda estéril de 15 a 20 mm de diámetro. Girar la sonda una vuelta completa y retirar el pedazo. Si no se necesita una muestra de la superficie, guardar la parte exterior (mínimo 2 cm) que contiene la envoltura interna para obturar el agujero(s) hecho en el queso y el resto del pedazo(s) con un escalpelo o un cuchillo estériles transferir asépticamente al frasco de muestra. Repetir este procedimiento hasta obtener una muestra no menor de 100 g.

Con los tapones, obturar los agujeros con cuidado, y si es posible, cubrir con un compuesto sellante adecuado, ver NTE INEN 1529-1.

b) *Toma de muestras de canales vacunas y ovinas.* Muestrear las canales con una de las siguientes técnicas:

b.1) *Hisopos o torundas.* Con guantes estériles colocar la plantilla (ver 4.2.2) sobre la superficie que se va a muestrear. Tomar asépticamente un hisopo, abrir un tubo que contenga el diluyente adecuado, humedecer el hisopo y con movimientos rotatorios presionarlo contra las paredes del tubo para retirar el exceso de diluyente. Friccionar fuertemente el área de la superficie que se va a examinar, haciendo frotos paralelos con una ligera rotación del hisopo. Friccionar nuevamente la superficie haciendo trazos paralelos perpendiculares a los anteriores, repetir tres veces este proceso humedeciendo cada vez el hisopo. Cuidar que se frote toda el área elegida. Regresar el hisopo al tubo y con una tijera estéril o cualquier otro implemento cortar o quebrar el palillo y dejar caer la cabeza dentro del tubo, tapar el tubo con la tapa de rosca y colocarlo en un envase a prueba de agua, acondicionar el envase con hielo picado o cualquier otro refrigerante disponible. Si el bastón no es de madera, agitar el hisopo en el tubo 10 veces hacia arriba



y abajo. Identificar la muestra. Para realizar recuentos, utilizar la cantidad necesaria del diluyente para obtener una dilución inicial de 10-1.

b.2) *Toma de muestras por disección.* Con un escalpelo y pinza estériles tomar lonchas superficiales muy delgadas de aproximadamente 2 mm de espesor de la herida del sacrificio, región pectoral, costado, regiones sacra, anal, renal y cuello. De las canales de cerdo, tomar a partir del cuello y del área situada detrás de las orejas. Colocar las lonchas en el frasco para muestras. Tomar una muestra no menor de 100 g

b.3) *Toma de muestras con portaobjetos.* Este método se utiliza especialmente para recuentos directos. Presionar un portaobjeto estéril contra la muestra del alimento, identificar y dejar que se seque. Enviar al laboratorio donde se fija, tiñe y se observa al microscopio. Para determinaciones cualitativas rápidas de la microflora dominante proceder de la siguiente manera: después de presionado el porta contra la superficie de la carne aplicar el porta a la superficie de agar de una placa y retirarlo con una pinza estéril y luego incubar la placa.

## **6. ENVÍO DE LAS MUESTRAS AL LABORATORIO.**

**6.1** Enviar las muestras al laboratorio lo más rápido posible y en condiciones que reduzcan al mínimo la posibilidad de cambio de su calidad microbiológica y evitar que durante el transporte las muestras sean expuestas a la luz solar directa.

**6.2** Manipular y empacar las muestras de modo que una manipulación posterior no pueda cambiar su identidad ni sugerir ninguna duda a cerca de su identidad.

**6.3** Siempre que sea posible, se deben enviar las muestras al laboratorio en su envase original, sin abrir. Todas las muestras envasadas, para su envío deben empacarse con materiales que puedan absorber los golpes para evitar que sufran daños durante el transporte.

**6.4** Los productos de vida comercial prolongada, no necesitan de precauciones especiales excepto, por ejemplo: evitar temperaturas por encima de 45°C para los productos enlatados (latas en su estado normal) y ambientes húmedos para los productos en polvo.

**6.5** Las latas hinchadas se deben refrigerar y enviarlas acondicionadas con mucho papel y material amortiguador y material refrigerante.

**6.6** Los productos perecederos no congelados se enfrían hasta 0 a 5°C, sea en un refrigerador o más rápidamente en un baño de hielo (en fundas plásticas) y se los envía en recipientes isotérmicos, cubiertos con una bandeja que contenga suficientes fundas plásticas con hielo picado o una mezcla de polialcoholes congelados, para mantener la temperatura de 0 a 5°C hasta su llegada al laboratorio. No utilizar hielo suelto ya que si el envase se revienta o tiene fugas puede contaminar el producto. Si se utiliza hielo seco, acondicionar la muestra de manera que no entre en contacto con el hielo para evitar su congelamiento.

**6.7** Productos congelados, las muestras de estos productos se deben recoger en recipientes preenfriados y colocarlos inmediatamente en un congelador, o en hielo seco. Enviar al laboratorio en un recipiente isotérmico, o en caja de cartón, con nieve carbónica (dióxido de carbono sólido). Evitar que las muestras congeladas, tomadas en fundas plásticas, entren en contacto directo con el hielo seco porque el plástico se torna friable y puede romperse. Utilizar papel u otro material adecuado para proteger la muestra. Como



control que la muestra no se ha descongelado durante el transporte, colocar dentro del paquete un recipiente con trocitos de hielo que deben estar intactos a la llegada del paquete con las muestras.

**6.8** Indicar claramente sobre el paquete si la muestra es peresible o no, la temperatura a que debe mantenerse, refrigerada en hielo seco, si es frágil, etc.

**6.9** Enviar las muestras juntamente con el informe de la toma (ver 5.1.4).

## **7. RECEPCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO.**

**7.1 Chequeo de las condiciones de las muestras.** Al recibir las muestras se debe observar los siguientes aspectos:

**7.1.1 Etiquetado e informe.** Chequear si cada muestra está debidamente sellada, etiquetada y acompañada de una copia del respectivo informe de la toma de muestras (ver 5.1.2 y 5.1.4).

**7.1.2 Estado de los envases.** Chequear cuidadosamente si el envase tiene defectos, tales como: fisuras, perforaciones, fugas, deformaciones; fracturas y tapas flojas en los de plástico; perforaciones en fundas plásticas.

**7.1.3 Control de la temperatura.** Anotar la temperatura de las muestras perecederas no congeladas. Las muestras congeladas deben llegar al laboratorio en su estado congelado, controlar si no ha habido descongelamiento (ver 6.7). Las muestras frescas perecederas deben tener una temperatura entre 0 a 5°C. Anotar cualquier discrepancia en la hoja de registro.

**7.1.4 Apego al programa de muestreo.** Verificar que el número de las muestras de población está conforme con el programa de muestreo utilizado.

**7.2 Almacenamiento de las muestras.** Las muestras deben almacenarse protegidas de cualquier contaminación, de la luz solar directa o de otras fuentes de calor y a las temperaturas que se indican:

**7.2.1** Productos congelados, a -20°C, máximo hasta siete días.

**7.2.2** Productos perecederos no congelados, entre 0°C y 5°C, por no más de 24 horas.

**7.2.3** Productos estables: enlatados, productos deshidratados, etc., a temperatura ambiente en lugares secos y frescos, hasta siete días.

**7.2.4** Productos misceláneos: enjuagues, hisopos, aguas de efluentes, entre 0°C y 4°C, hasta 12 h.

## **8. PREPARACIÓN DE LA UNIDAD DE MUESTRA PARA EL ANÁLISIS**

**8.1 Generalidades.** Implica la preparación en el laboratorio de una submuestra de modo que sea tan representativa como sea posible de la muestra de población de la cual procede.

**8.1.1** Si es posible, realizar los ensayos de las muestras luego después de la recepción en el laboratorio. Las muestras deben manipularse asépticamente y de preferencia sin interrupciones, si éstas son inevitables, deben ser lo más cortas posible y el producto se debe mantener en refrigeración durante este período.

**8.1.2** Antes de manipular la muestra limpiar el área de trabajo y sus proximidades, e inmediatamente desinfectar el área con etanol al 70% o con cualquier otro desinfectante.



**8.1.3** En muchos casos la unidad de muestreo, sin preparación adicional alguna, puede utilizarse como unidad de muestra. Si se necesita mezclar dos o más unidades de muestreo para formar la unidad de muestra, transferir las unidades de muestreo a un recipiente estéril suficientemente grande y mezclar bien.

**8.1.4** Antes de abrir cualquier envase, sean éstos rígidos o semirígidos, limpiar externamente el envase con jabón o detergente y agua, secarlos con papel toalla y, en las proximidades de la tapa o en el área donde se va a abrir el envase flamear (con o sin etanol al 70% v/v evitando sobrecalentamientos) o aplicar una mezcla desinfectante que se le deja secar sin aplicar calor; sin embargo, cuando el envase o el material del embalaje es muy delgado y no resiste el proceso de limpieza omitir este paso y desinfectar con mucho cuidado. Cuando el envase puede removerse sin riesgo alguno de contaminar el producto, entonces, la limpieza y desinfección del envase no son necesarias. Todas las manipulaciones, durante y después de la abertura deben realizarse en condiciones tan asépticas como posible y de preferencia sin interrupciones; utilizar una cámara de flujo laminar vertical, si es posible. Durante cualquier interrupción se debe mantener el producto bajo refrigeración. El intervalo entre la agitación de la muestra y la remoción de la unidad analítica no debe ser mayor de tres minutos, y se debe tener cuidado para eliminar, incluso, cualquier espuma de la unidad analítica.

**8.1.5** Abrir los envases de lata por la tapa no codificada, cuidando de no dañar el doble cierre.

**8.1.6** Al tomar muestras de latas abombadas deben observarse las siguientes precauciones a fin de disminuir la salida violenta del contenido:

**8.1.6.1** Abrir las latas abombadas en sitios especiales y NUNCA deben abrirse en áreas destinadas a pruebas de esterilidad.

**8.1.6.2** Antes de abrir, refrigerar la lata lavada y seca.

**8.1.6.3** Colocar la lata en una bandeja poco profunda que contenga una mezcla desinfectante, ver NTE INEN 1529.1. Si se sospecha la presencia de *Clostridium botulinum*, la bandeja debe contener una solución saturada de carbonato de sodio.

**8.1.6.4** Desinfectar la lata frotando una mezcla desinfectante y dejando secarse, pero, NUNCA aplicando calor.

**8.1.6.5** Para tapar la lata, utilizar un embudo de vidrio que tenga el vástago largo y firmemente taponado con algodón hidrófilo, a través del cual pasa un varilla de acero con su extremidad inferior afilada (todo el aparato debe estar envuelto, y esterilizado). Cubrir la lata con el embudo y sobre la tapa de ésta hacer descansar el extremo afilado de la varilla, y luego, cuidadosamente, golpear la varilla.

**8.1.6.6** Abrir la lata después que la presión ha descendido, y según proceda, continuar con uno de los procedimientos indicados a continuación:

## **8.2 Procedimiento**

### **8.2.1 Líquidos**

**8.2.1.1** Si el espacio de cabeza es lo suficientemente grande, se debe mezclar el producto agitando el envase 25 veces en 10 segundos haciendo un arco de 300 mm. Se puede utilizar un homogeneizador estandarizado para asegurar una distribución uniforme de los microorganismos.

**8.2.1.2** Si el espacio de cabeza es pequeño, mezclar el producto invirtiendo el envase 25 veces y luego:

- a) retirar una porción de líquido hasta que haya suficiente espacio de cabeza y entonces mezclar mediante agitación (ver 8.2.1.1); o
- b) transferir la muestra completa, o una parte de ella, a un envase estéril de tamaño adecuado y agitando mezclar bien (ver 8.2.1.1). En el caso de muestras líquidas con gas, incorporar unas perlas de vidrio estériles y agitar.

**8.2.2** *Polvos*. Seguir los procedimientos indicados en 8.2.1.1 y 8.2.1.2 utilizando una espátula estéril.

**8.2.3** *Productos congelados*. Si las muestras están congeladas, utilizar una de los siguientes procedimientos:

**8.2.3.1** Descongelarlas parcialmente en su recipiente original cerrado (o en el que llegó al laboratorio), por no más de 24 h en un refrigerador entre 2°C y 5°C. Cuando se necesitan más de 24 h para descongelar las muestras, se pueden colocar en un baño de agua a una temperatura menor de 37°C y se les mantiene solo hasta que se fundan (máximo hasta 15 minutos, pero, la temperatura debe permanecer baja para evitar lesionar a los microorganismos) o, a temperatura ambiente por no más de 1 hora.

**8.2.3.2** Si la muestra congelada puede picarse fácilmente, el descongelamiento no es necesario.

**8.2.3.3** Con productos fácilmente descongelables (productos obtenidos con taladro, por ejemplo: jugos congelados, huevos congelados, etc.), se les descongela en un baño de agua o a temperatura ambiente, según se indica en 8.2.3.1.

**8.2.3.4** Los helados se funden según se indica en el numeral 8.2.3.1 (si se encuentran en su envase original primero se los transfiere a un frasco estéril con tapa). Mezclar bien la muestra fundida.

**8.2.4** *Mantequilla, margarinas y mantecas*.

**8.2.4.1** Colocar la muestra de mantequilla en el refrigerador (4°C  $\pm$  1°C), hasta que se torne dura y se pueda cortar.

**8.2.4.2** Con utensilios estériles, dividir la muestra de mantequilla, margarina o manteca en tres partes y del centro de cada una de estas superficies (no contaminadas) que quedan expuestas, pesar la unidad analítica en un frasco y añadir el diluyente (ver 4.3.11) a 32°C, en un volumen necesario para completar, juntamente con la fase acuosa, dos veces la unidad analítica, por ejemplo: las mantequillas y margarinas que tengan una humedad de 16%, pesar 25 g de muestra y añadir 46 cm<sup>3</sup> de diluyente; si se pesan 50 g, añadir 92 cm<sup>3</sup>.

**8.2.4.3** En el caso de las mantecas añadir un volumen igual a dos veces la muestra: 25 g de muestra y 50 cm<sup>3</sup> diluyente.

**8.2.4.4** Colocar el frasco en un baño de agua a no más de 45°C y, evitando un calentamiento excesivo, agitar hasta que la muestra y el diluyente se mezclen completamente.

**8.2.4.5** Conservar el frasco en el baño de agua hasta que la materia grasa se separe de la fase líquida. Utilizar esta fase líquida para las determinaciones microbiológicas: 2 cm<sup>3</sup> de

este líquido corresponden a 1 g de muestra y 0,2 cm<sup>3</sup> a 0,1 g. Continuar el ensayo según lo indicado en 9.2.1.2

**8.2.5 Mayonesa.** Preparar la muestra según lo indicado en 8.2.4

**8.2.6 Carnes y otros productos.** Cuando por su naturaleza, el producto en análisis puede causar dificultades si se homogeneiza directamente, entonces, antes de manipular, aséptica mente proceder según 8.2.6.1 y/o 8.2.6.2

**8.2.6.1 Picado.** Colocar el material en una superficie estéril, cortar en cubos de 1 cm<sup>3</sup> y continuar según lo indicado en 8.2.6.2.

**8.2.6.2 Trituración.** Colocar el material (picado o no) en un frasco estéril, adicionar el exudado que hubiere, mezclar, homogeneizar dos veces y continuar según lo indicado en 9.2.2.

**8.2.7 Canales de aves y productos misceláneos.** Anotar el peso de la muestra, colocar la canal en una funda plástica estéril y lavar con 300 cm<sup>3</sup> de agua peptonada al 0,1% friccionando la superficie de la muestra durante 30 segundos. Aplicar este procedimiento a frutas secas, cereales, legumbres y ensaladas, lavando con una cantidad de diluyente 10 veces el peso de la muestra. Si es necesario, continuar como se indica en 9.2.1.3

**8.2.8 Hisopos o torundas.** Al tubo que contiene el hisopo juntamente con el diluyente (ver 5.3.2.7 literal b.1) y 5.3.2.4), agitarlo vigorosamente, haciendo 50 ciclos completos de 15 cm en 10 segundos golpeando contra la palma de la otra mano, para desprender los microorganismos de la superficie del hisopo. La dispersión obtenida se puede diluir decimalmente. Si es necesario, continuar como se indica en 9.2.1.3.

**8.2.9 Productos formados por capas.** Si el alimento está formado por capas o extractos, examinar una porción de 10 g del paquete completo o, separadamente, preparar una suspensión inicial de cada una de estas partes, dependiendo del propósito del ensayo. Preparar como se indica en 9.2.2.

## **9. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN INICIAL O DILUCIÓN PRIMARIA Y OTRAS DILUCIONES**

### **9.1 Generalidades.**

**9.1.1** El tamaño de la unidad muestra generalmente es 10 g ó 10 cm<sup>3</sup> o un múltiplo de 10 y, debe ser tal, que permita realizar todos los ensayos requeridos.

**9.1.2** Para la detección de *Salmonella*, en general, preparar la suspensión inicial con una unidad de muestra de 25 g (cm<sup>3</sup>) y 225 cm<sup>3</sup> del diluyente indicado en la NTE INEN 1529-15. Si la unidad de muestra prescrita difiere de 25 g, utilizar la cantidad necesaria de diluyente para obtener una dilución de aproximadamente 1/10 (masa/volumen). Ver nota 5.

NOTA 5 Con el objeto de reducir la sobrecarga de trabajo en el laboratorio, y cuando hay evidencias de que la mixtura de dos o más unidades de muestra no afecta el resultado para aquel alimento particular, existe la alternativa de preparar unidades de muestra compuesta. El tamaño máximo de una unidad de muestra compuesta es de 375 g (15 unidades de muestra de 25 g). Por ejemplo, si es necesario analizar 10 unidades de muestra de 25 g, se mezclan las 10 unidades para formar una unidad de muestra compuesta de 250 g y se adicionan 2,25 litros del diluyente, ver NTE INEN 1529-15. Alternativamente, se puede preparar una muestra compuesta transfiriendo alícuotas de 0,1

cm<sup>3</sup> de cada uno de los 10 cultivos de pre-enriquecimiento a un frasco que contenga 100 cm<sup>3</sup> de caldo RV, o alícuotas de 10 cm<sup>3</sup> a un frasco que contenga 1 litro de caldo selenito cistina o caldo tetratiónato.

**9.1.3** Mezclar la unidad de muestra o porción de ensayo con un volumen de diluyente igual a nueve veces el peso de la unidad analítica. Si se obtiene una suspensión inicial demasiada o viscosa o espesa adicionar más diluyente. Esto se debe tener en cuenta para las operaciones subsiguientes y/o expresión de resultados.

**9.1.4** Para evitar lesionar a los microorganismos por cambios súbitos de la temperatura, la temperatura de los diluyentes debe ser aproximadamente la misma de la muestra, a menos que haya otra indicación.

**9.1.5** La preparación de la suspensión inicial de algunos tipos de productos necesitan de cuidados especiales, tales como:

**9.1.5.1** Calentar a temperaturas inferiores a 45°C por no más de 15 minutos productos como el cacao en polvo, gelatina, productos en polvo, mantecas, mantequillas. Para los quesos utilizar el diluyente a 44°C ± 1°C.

**9.1.5.2** Neutralizar los alimentos ácidos con una solución estéril de fosfato tripotásico al 8%, antes de preparar la suspensión inicial.

**9.1.5.3** Reconstituir los productos deshidratados y revitalizar a los microorganismos lesionados por los procesos de elaboración y almacenamiento de los productos alimenticios.

**9.1.5.4** Para productos grasosos o pulverulentos que forman grumos adicionar al diluyente un agente humectante tal como el "Tergitol Aniónico 7" (1% m/v).

**9.1.5.5** Cuando se va a realizar recuento de esporos, a la suspensión inicial, inmediatamente después de preparada, someterla a un tratamiento térmico (por ejemplo, 80°C por 10 minutos) seguido de un enfriamiento rápido en un baño de agua helada.

## **9.2 Suspensión inicial o dilución primaria (10-1)**

**9.2.1 Líquidos:** Productos líquidos no viscosos (agua, leche, jugos, enjuagues, etc.) en los cuales los microorganismos se distribuyen homogéneamente o que fácilmente se los puede homogeneizar por medios mecánicos; fase líquida de mezclas heterogéneas que se considera que es lo suficientemente representativa de la muestra en conjunto (fase líquida de las grasa vegetales o animales) y productos líquidos viscosos.

**9.2.1.1** Líquidos no viscosos, con una pipeta estéril transferir 10 cm<sup>3</sup> a un frasco y añadir 90 cm<sup>3</sup> de diluyente. Mezclar cuidadosamente esta solución agitando el frasco 25 veces en 10 segundos haciendo un arco de 300 mm, o aspirando 10 veces con una pipeta estéril, o utilizando un homogeneizador tipo "vortex" por 5 a 10 segundos. Seleccionar la velocidad de tal manera para que el líquido, en torbellino, suba hasta 2 o 3 cm del borde del vaso. Si se requieren otras diluciones, continuar según lo indicado en 9.3.

**9.2.1.2** De las mantequillas y mantecas, de la fase líquida (ver 8.2.4.5) tomar 2 cm<sup>3</sup> y añadir 8 cm<sup>3</sup> de diluyente, se obtiene la dilución 10-1. Para otras diluciones, continuar según lo indicado en 9.3.

**9.2.1.3** Enjuagues, la solución de enjuague obtenida en los numerales 8.2.7 y 8.2.8 constituye la dilución primaria, siempre que, para el enjuague se utilice el volumen

adecuado de diluyente (ver 5.3.2.7 literal b.1). Para otras diluciones, continuar como se indica en 9.3.

**9.2.1.4** De los líquidos viscosos y helados fundidos (ver 8.2.3.4) pesar 10 g de muestra en 90 cm<sup>3</sup> de diluyente y mezclar bien mediante agitación (para pesar, se puede utilizar una cuchara o una pipeta, dependiendo de la consistencia de la muestra). Para otras diluciones continuar según lo indicado en 9.3.

**9.2.2** *Productos sólidos.* (Ver notas 6)

**9.2.2.1** Pesar con una precisión de 0,1 g en un frasco (si se utiliza homogeneizador rotatorio), o en una funda plástica (si se utiliza "stomacher") 10 g (o un múltiplo de 10 g) de la muestra de población o de la submuestra preparada. Añadir 90 cm<sup>3</sup> de diluyente (o múltiplo de 90) a la temperatura adecuada (dilución 10-1).

**9.2.2.2** Hacer funcionar el homogeneizador a baja velocidad y en pocos segundos pasar a la velocidad entre 15 000 a 20 000 rpm. Cuidar escrupulosamente que el tiempo de homogeneización a alta velocidad no exceda los dos minutos. Para productos blandos o que forman mucha espuma es suficiente un minuto.

**9.2.2.3** Hacer funcionar el "stomacher" 1 ó 2 minutos, según la naturaleza del producto (ver nota 6.2).

**9.2.2.4** Si es necesario, dejar en reposo hasta 15 minutos para que las partículas grandes se sedimenten. Para preparar otras diluciones utilizar la capa superficial y si hay una capa de grasa, tomar de la parte acuosa.

**9.3** *Otras diluciones.* (Ver nota 7)

**9.3.1** Si la dilución primaria se homogeneizó con pipeta, utilizar la misma pipeta para transferir 1 cm<sup>3</sup> de la suspensión inicial (dilución 10-1) a otro tubo que contenga 9 cm<sup>3</sup> de diluyente estéril a la temperatura adecuada, evitar que la pipeta entre en contacto con el diluyente y con otra pipeta estéril mezclar cuidadosamente. De esta manera se obtiene la dilución 10-2.

**9.3.2** Si es necesario, repetir lo indicado en el numeral 9.3.1 para la dilución 10-3 y siguientes diluciones, hasta obtener el número necesario de diluciones y alcanzar el número adecuado de microorganismos por cm<sup>3</sup>. Cada dilución sucesiva disminuirá 10 veces la concentración.

**9.4 Duración del procedimiento.** El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y la mezcla de las diluciones con el medio de cultivo (descrito en el método específico de ensayo) no debe ser mayor que 45 minutos. El tiempo transcurrido entre la preparación de la suspensión inicial y el inicio de la preparación de las siguientes diluciones no debe exceder los 30 minutos.

**9.5 Revitalización**

**9.5.1** Los microorganismos presentes en los alimentos pueden estar lesionados o debilitados debido a los tratamientos que se utilizan en el procesamiento de alimentos. Entre los tratamientos que lesionan a los microorganismos tenemos el calor, frío, desecación, liofilización, congelación, baja actividad de agua e irradiación. Los tratamientos químicos



adversos como carencia de nutrientes, pH bajo, preservantes y exposición a desinfectantes.

**NOTAS 6:**

6.1 Con algunos productos no es aconsejable utilizar el "stomacher" (por ejemplo, los que tienen elementos puntiagudos o cortantes, o aquellos que no se disgregan fácilmente), pudiéndose utilizar siempre que haya evidencia (datos publicados o ensayos comparativos) que los resultados obtenidos no difieren significativamente de los obtenidos con un homogeneizador rotatorio.

6.2 Prestar atención al hecho que para determinados productos, en especial cereales, los tiempos de 1 y 2 minutos no son adecuados para microorganismos tales como los mohos y levaduras. En este caso el "stomacher" permite una mejor recuperación que el homogeneizador rotatorio. Hacer funcionar el "stomacher" por 10 minutos evitando separaciones, ya que se pueden perder algunos mohos y levaduras del líquido sobrenadante.

NOTA 7 Para las pruebas de presencia o ausencia de microorganismos en 0,1 cm<sup>3</sup> ó 0,1 g de producto, no se necesita preparar las siguientes diluciones.

**9.5.2** El número de microorganismos que son detectados en los diferentes medios depende de la severidad y duración de las condiciones adversas, tipo de microorganismos presentes y la composición del medio utilizado, especialmente si es selectivo.

**9.5.3** Cuando es necesario, los procedimientos de revitalización están incluidos en las secciones pertinentes de las NTE INEN 1529.



#### 4. NMX-F-103-1982.

### **ALIMENTOS. FRUTAS Y DERIVADOS. DETERMINACIÓN DE GRADOS BRIX. FOODS. FRUITS AND DERIVATIVES. DETERMINATION OF DEGREES BRIX. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.**

#### 1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta Norma Mexicana establece el método refractométrico para la determinación de los grados Brix en productos derivados de las frutas y líquidos azucarados.

#### 2. DEFINICIÓN

Para los efectos de esta Norma, se establece la siguiente definición:

Grados Brix: Es el por ciento de sólidos disueltos en un producto derivado de las frutas o de un líquido azucarado.

#### 3. FUNDAMENTO

Este método se basa en el cambio de dirección que sufren los rayos luminosos en el límite de separación de dos medios en los cuales es distinta la velocidad de propagación.

#### 4. REACTIVOS Y MATERIALES

- Alcohol
- Éter de petróleo
- Bromonaftaleno
- Papel

#### 5. APARATOS Y EQUIPO

##### 5.1 Aparatos

Refractómetro Abbé

RECOPIADO POR: EL PROGRAMA UNIVERSITARIO DE ALIMENTOS

#### 6. PROCEDIMIENTO

Colocar el refractómetro en una posición tal que difunda la luz natural o cualquier otra forma de luz artificial, que pueda utilizarse para iluminación. Hacer circular agua a 293 K





(20°C) a través de los prismas. Limpiar cuidadosamente con alcohol y éter de petróleo el refractómetro antes de hacer la lectura.

Para cargar el refractómetro abrir el doble prisma girando el tornillo correspondiente y poner unas gotas de muestra sobre el prisma, cerrar y ajustar finamente.

Verificar la exactitud del refractómetro con agua a 293 K (20°C) a esta temperatura, el índice de refracción del agua es de 1.3330, o bien utilizar la placa de cuarzo que viene con el equipo, usando bromonaftaleno, al leer hacer las correcciones necesarias.

Mover el brazo giratorio del aparato hacia delante y hacia atrás hasta que el campo visual se divida en dos partes, una luminosa y otra oscura. La línea divisoria entre esas dos partes, se le conoce como "línea margen". Ajustar la línea margen y leer directamente el por ciento de sólidos en la escala Brix.

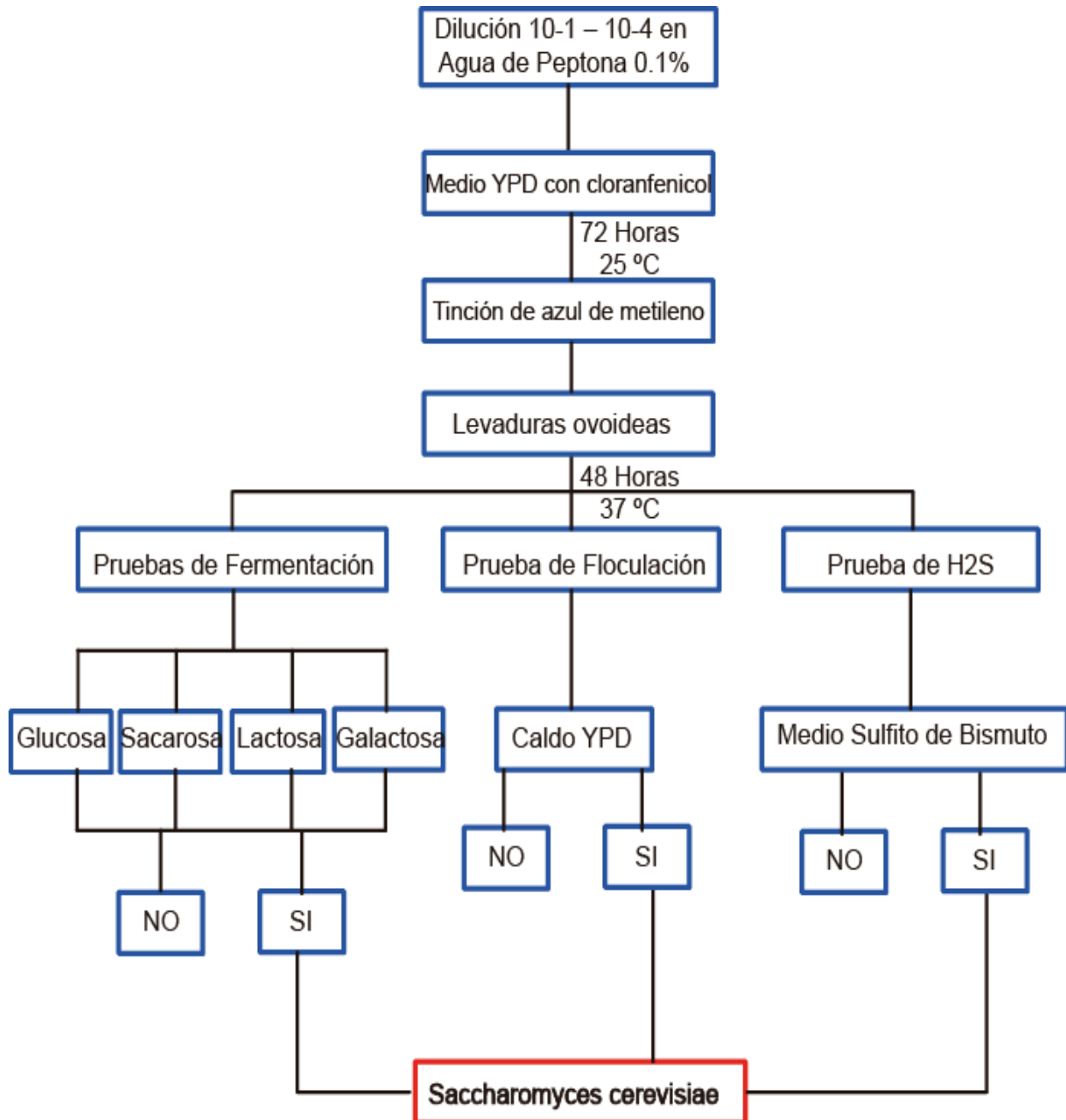
Nota: Esta método también incluye tanto a los refractómetros manuales (o portátiles), en los cuales únicamente se coloca la muestra y se observa a contraluz para tomar la lectura directamente; como a los refractómetros digitales en los cuales el mismo procedimiento anteriormente descrito en esta norma, se simplifica siguiendo las indicaciones específicas que para cada aparato proporciona el fabricante.

## 7. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados deben expresarse en grados Brix, previa corrección por temperatura.

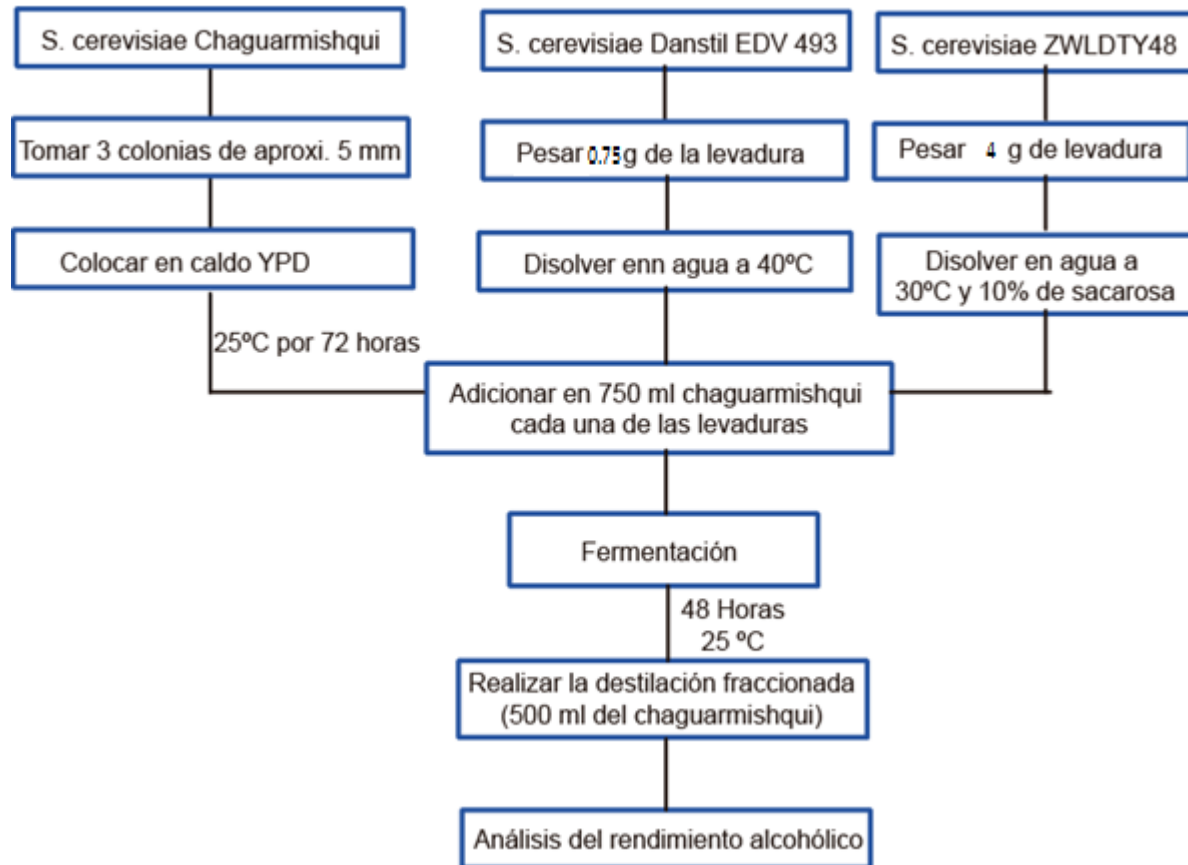


## 5. OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA *Saccharomyces cerevisiae*

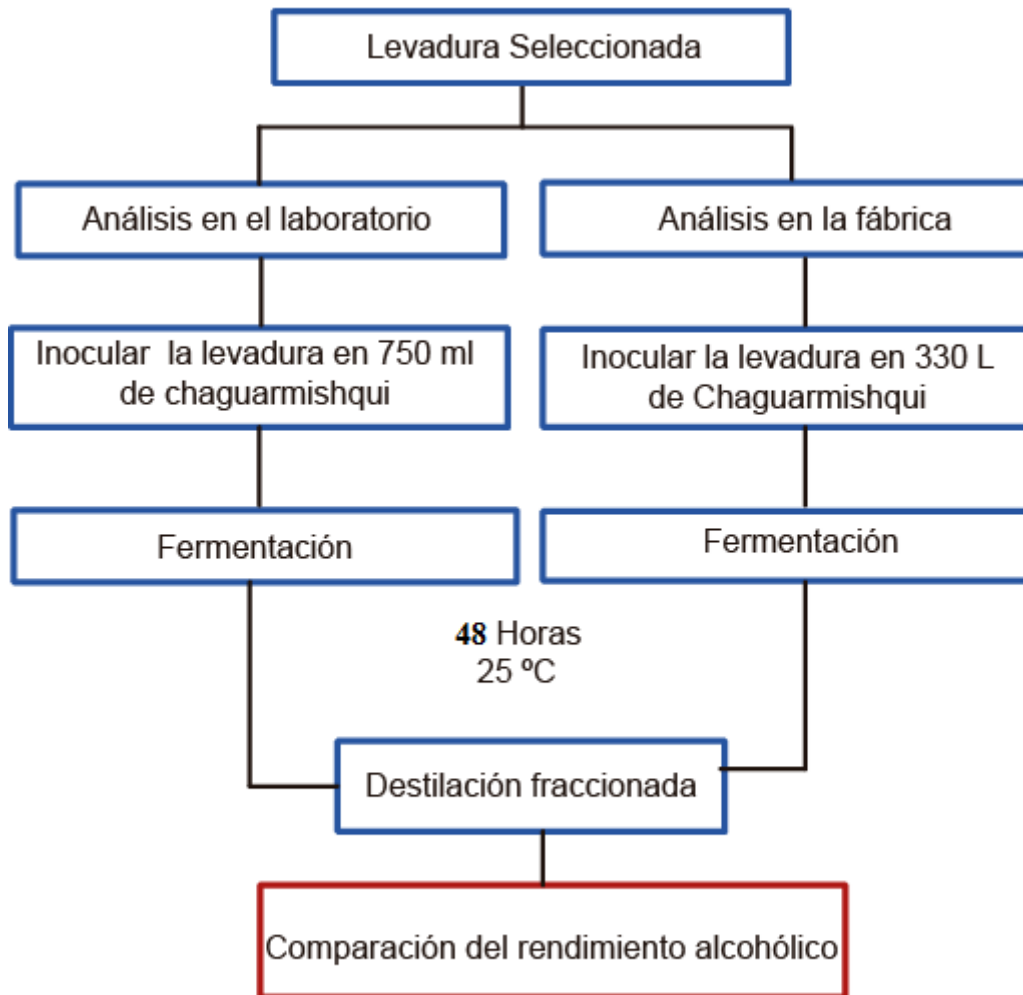


## 6. PROCESO DE FERMENTACIÓN Y DESTILACIÓN EN EL LABORATORIO

### PROCESO DE FERMENTACION Y DESTILACION EN EL LABORATORIO



## 7. PROCESO DE FERMENTACIÓN Y DESTILACIÓN EN LA FÁBRICA Y EN EL LABORATORIO



**8. TABLA DE DATOS:** EVALUACIÓN DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN CON LAS LEVADURAS COMERCIALES Y SILVESTRE AL INICIO Y AL FINAL DE LA FERMENTACIÓN.

	Inicio de la Fermentación		Fin de la Fermentación	
	°Brix	pH	°Brix	Ph
<b>Silvestre</b>	6,8	3,5	4,4	3,0
	6,8	3,5	4,4	3,0
	6,8	3,5	4,3	3,0
	6,8	3,5	4,4	3,0
	6,8	3,5	4,3	3,0
PROMEDIO	<b>6,8</b>	<b>3,5</b>	<b>4,4</b>	<b>3,0</b>
DESVIACION ESTANDAR	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,1</b>	<b>0</b>
<b>Danstil EDV 493</b>	6,8	3,5	4,2	3,0
	6,8	3,5	4,2	3,0
	6,8	3,5	4,1	3,0
	6,8	3,5	4,1	3,0
	6,8	3,5	4,2	3,0
PROMEDIO	<b>6,8</b>	<b>3,5</b>	<b>4,2</b>	<b>3,0</b>
DESVIACION ESTANDAR	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,1</b>	<b>0</b>
<b>ZWLDTY48</b>	6,8	3,5	4,0	3,0
	6,8	3,5	4,0	3,0
	6,8	3,5	4,0	3,0
	6,8	3,5	4,0	3,0
	6,8	3,5	4,0	3,0
PROMEDIO	<b>6,8</b>	<b>3,5</b>	<b>4,0</b>	<b>3,0</b>
DESVIACION ESTANDAR	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

## 9. TABLAS DE DATOS: RESULTADOS OBTENIDOS EN LA DESTILACIÓN A NIVEL DEL LABORATORIO DE LAS DIFERENTES LEVADURAS

	REPLICADO	Volumen inicial (mL)	Volumen final (mL)	CABEZA (mL)	CUERPO (mL)	COLA (mL)	PERDIDA (mL)	Rendimiento (%)
<b>S C. DEL CHAWARMISHQUE</b>	1	500	448	1	43	5	2,5	8,6
	2	500	448	1	45	4	2	9
	3	500	448,5	1	44	4,5	2,5	8,8
	4	500	448	1	44	4	2	8,8
	5	500	448,2	1	44	5	2	8,8
PROMEDIO			<b>448,1</b>		<b>44,0</b>	<b>4,5</b>	<b>2,2</b>	<b>8,8</b>
DESVIACION ESTANDAR			<b>0,2</b>		<b>0,7</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>	<b>0,1</b>

<b>S.c. DANSTIL EDV 493</b>	1	500	441	1	50	5	3	10
	2	500	440	1	52	5	2	10,4
	3	500	439,5	1	53	5,1	1	10,6
	4	500	441	1	51	5	2	10,2
	5	500	440	1	52	5,5	3	10,4
PROMEDIO			<b>440,3</b>	<b>1,0</b>	<b>51,6</b>	<b>5,1</b>	<b>2,2</b>	<b>10,3</b>
DESVIACION ESTANDAR			<b>0,7</b>	<b>0,0</b>	<b>1,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,8</b>	<b>0,2</b>

<b>S.c. ZWLDTY48</b>	1	500	436	1	56	4,5	2	11,2
	2	500	437	1	56	4	3	11,2
	3	500	435	1	57	5	2	11,4
	4	500	436	1	55	5	2,1	11
	5	500	437	1	56	5	2	11,2
PROMEDIO			<b>436,2</b>		<b>56,0</b>	<b>4,7</b>	<b>2,2</b>	<b>11,2</b>
DESVIACION ESTANDAR			<b>0,8</b>		<b>0,7</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	<b>0,1</b>

Cuenca, 06 de junio de 2014

Doctora

Silvana Donoso

DECANA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCA

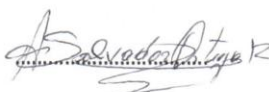
Ciudad

De mi consideración:

Por medio de la presente informo a usted y por su intermedio a los Doctores miembros del tribunal de la tesis titulada "OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN LA FABRICACIÓN DE TEQUILA EN LA FÁBRICA "TRANCAHUAICO" OÑA-PROVINCIA DEL AZUAY" que fue desarrollado por el señor Juan Israel Guillermo Quinde con número de cedula 0105469407 y la señora Andrea Fernanda Macías Matamoros con número de cedula 0704800796, durante el periodo comprendido entre septiembre y diciembre del año 2013, en las instalaciones de la empresa TRANCAHUAICO de mi propiedad.

Es todo en cuanto puedo informar en honor a la verdad.

Atentamente,



Sr. Salvador Ortega

PROPIETARIO DE LA FÁBRICA TRANCAHUIACO

## 8. ILUSTRACIONES

### 1. Recolección de muestras



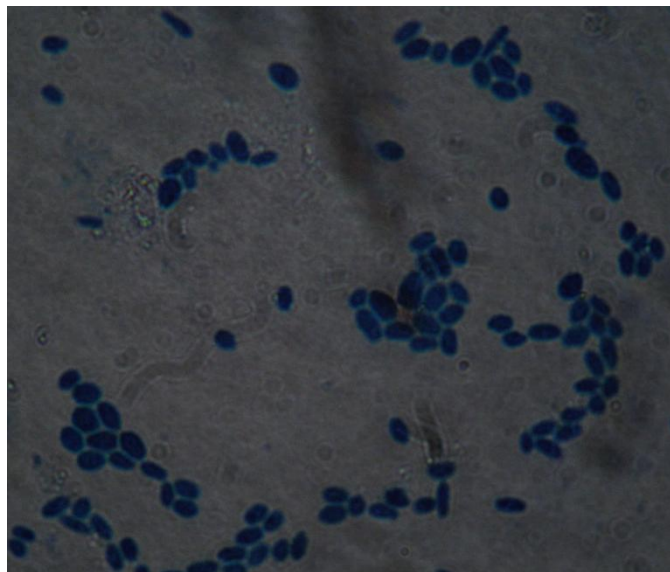
### 2. Diluciones de la muestra



### 3. Colonias de *Saccharomyces cerevisiae* en Agar YPD

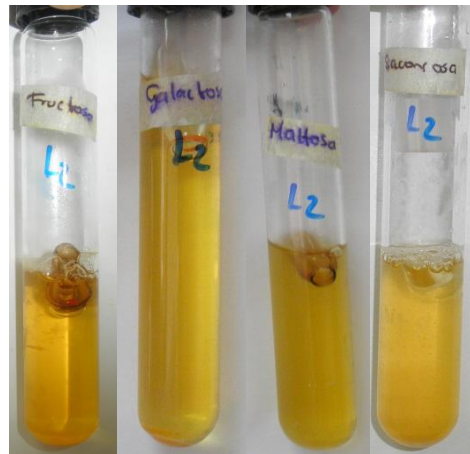


### 4. Levaduras teñidas con Azul de metileno visto con lente de 40x





## 5. Prueba de Azúcares reductores (Glucosa, Sacarosa, Galactosa, Manosa)



## 6. Prueba de Hidrógeno sulfurado en Agar Bismuto Sulfito



## 7. Prueba de Floculación en Caldo YPD



## 8. Levadura DANSTIL 493 EDV



## 9. Levadura ZWLDTY48



## 10. Fermentación en el Laboratorio



### 11. Fermentación en la Fábrica



### 12. Fermentación en la Fábrica



### 13. Destilación

